

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 41 768 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
C 12 N 1/19
C 12 N 15/81

②1 Aktenzeichen: 199 41 768.7
②2 Anmeldetag: 2. 9. 1999
④3 Offenlegungstag: 15. 3. 2001

⑦1 Anmelder:
Lichtenberg-Fraté, Hella, Dr., 53115 Bonn, DE

⑦2 Erfinder:
gleich Anmelder

⑤6 Entgegenhaltungen:
Eur. J. Biochem. 260, S.31-37; 1999;
J. Membrane Biol. 152, S.169-181, 1996;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Schizosaccharomyces pombe Hefewirbstämme mit Defekten in der Kaliumaufnahme

⑤7 Gegenstand der Erfindung sind Schizosaccharomyces pombe Hefewirbstämme mit Defekten in den Kaliumtransportproteinen TKHp und Trk2.
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Schizosaccharomyces pombe Hefewirbstamm, der die Nukleinsäuresequenz für den humanen erg Kaliumionen-Kanal (HERG), aber nicht die der Hefe eigenen TKHp oder Trk2 Kaliumionen-Transportproteine exprimiert sowie ein Verfahren zur Detektion spezifischer Modulatoren des HERG Kaliumionen-Kanals, einschließlich:
a) Die Behandlung des Schizosaccharomyces pombe Hefewirbstamms, der die Nukleinsäuresequenz für den humanen erg Kaliumionen-Kanal oder ein funktionelles Derivat oder eine Mutationsform dieses Kaliumionen-Kanals, aber nicht die der Hefe eigenen TKHp oder Trk2 Kaliumionen-Transportproteine exprimiert mit Testsubstanzen,
b) Wachstumsbestimmungen in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz,
c) Messungen des Anstiegs oder der Abnahme des Kaliumtransportes derjenigen Stämme in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz.

DE 199 41 768 A 1

BEST AVAILABLE COPY

DE 199 41 768 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft *Schizosaccharomyces pombe* Hefewirtsstämme entsprechend dem Oberbegriff des Anspruchs I.

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung sind *Schizosaccharomyces pombe* Hefewirtsstämme mit Defekten in der Kaliumaufnahme, deren Verwendung zur Expression von Kaliumionen Kanälen sowie Prozesse zur Identifizierung von Inhibitoren und/oder Aktivatoren solcher Kaliumkanalproteine.

Die Hefe *Schizosaccharomyces pombe* nimmt als einzelliger Eukaryont Kalium aus der extrazellulären Umgebung auf und akkumuliert dieses Kation intrazellulär bis zu einer Konzentration von 180 mM (180 µmol/µl Zellwasser). Diese Kaliumaufnahme geschieht auch unter Bedingungen, in denen die extrazelluläre Konzentration von Kalium unter 30 µM sinkt.

Verantwortlich für diesen einwärts gerichteten Kaliumtransport ist u. a. ein in der Plasmamembran dieser Hefe lokalisierendes Transportprotein TKHp (Transporter von Kalium und Protonen H⁺). Die Kaliumaufnahme und Kaliumtransportfunktion des *Schizosaccharomyces pombe* Proteins TKHp ist beispielsweise beschrieben in:

- Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J. D., Heyer, M., Höfer, M. (1996). J. Membrane Biol. 152: 169-181

Ein *Schizosaccharomyces pombe* Hefestamm mit einer Mutation im TKHp ist im Vergleich zu dem Wildstamm weiterhin in der Lage auf Medien mit so geringen extrazellulären Kaliumkonzentrationen wie 1 mM oder weniger im Kulturmedium gut zu wachsen, wie z. B. beschrieben in:

- Balcells et al., (1999) Eur. J. Biochem. 260: 31-37

Vom Sanger Center, Cambridge, England wurde 1997 aus dem Gesamtgenom der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* ein vermutliches Gen SPAC1F5.12 (Chromosom I, Cosmid C1F5, offener Leserahmen 12) veröffentlicht.

- <http://www.sanger.ac.uk/yeast/home.html>

dessen abgeleitete Aminosäuresequenz hohe Ähnlichkeit (37%) mit dem Kaliumaufnahmeprotein TKHp aus *Schizosaccharomyces pombe* aufweist. Dieses Gen ist bisher nicht isoliert und/oder funktionell charakterisiert worden.

Das bisher bekannte und zur Kaliumaufnahme notwendige Transportprotein TKHp und das vermutete zweite Kaliumtransportprotein aus *Schizosaccharomyces pombe* gehören aufgrund der hohen Homologie sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Aminosäureebene zu einer phylogenetisch konservierten Klasse von Kaliumtransportproteinen (Transporter von Kalium), deren nächst verwandte Mitglieder in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben wurden, z. B. in:

- Rodriguez-Navarro, A. and Ramos, J. (1984). J. Bacteriol. 159: 940-945

- Gaber, R. F., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1988). Mol. Cell. Biol. 8: 2848-2859

- Ko, C. and Gaber, R. F. (1991). Mol. Cell. Biol. 11: 4266-4273

Aus einer Vielzahl von Spezies wurden durch die Anwendung von molekularbiologischen Techniken eine Reihe von Kaliumkanälen isoliert. Allgemein sind Ionenkanäle Transmembranproteine, die selektiv den Fluß bestimmter, spezifischer Ionen durch Membranen vermitteln. Unter den bisher bekannten Ionenkanälen stellen Kaliumkanäle (K⁺-Kanäle) die zahlreichste und heterogenste Gruppe dar. Sowohl in erregbaren als auch in nicht-erregbaren Zellen sind sie ihr die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials verantwortlich. Die durch Kaliumionen-Kanäle vermittelten Auswärtsströme sind die Grundlage sowohl der Form und Frequenz als auch der Repolarisierung von Aktionspotentialen in erregbarem Gewebe. Kaliumionen-Kanäle sind ubiquitäre Membranproteine mit einer erstaunlichen Vielfalt elektrischer Eigenschaften, wobei viele der "klassischen" spannungsabhängigen K⁺-Kanäle der sogenannte Kv-Familie (Abkürzung v ihr voltage = spannungsabhängig) zugeordnet werden.

Während der letzten Jahre demonstrierten eine Reihe von Arbeiten eine Anzahl menschlicher Krankheiten als Resultat von Mutationen in für Kaliumionen-Kanäle kodierenden Genen. So verursacht z. B. eine Punktmutation im Kaliumkanal Kv1.1 die Episodische Ataxie wie beschrieben in:

- Adelman, J. P., Bond, C. T., Pessia, M. and Mylie, J. (1995). Neuron 15: 1449-1454

Das LQT Syndrom ist eine Krankheit, die die ventrikuläre Repolarisation betrifft. Eine verzögerte Repolarisation ventrikulärer Myocyten verursacht eine Verlängerung des QT Intervalls im Elektrokardiogramm (EKG). Das LQT Syndrom wird meist als autosomal dominante oder rezessive Krankheit vererbt. Wenn die ventrikulären Arrhythmien zur Fibrillation degenerieren kann plötzlicher Tod die Folge sein.

In diesem Zusammenhang ist die Rolle des humanen *erg* (human *eag* related gene, HERG) Kaliumionen-Kanals im Herzen von besonderem Interesse. In ventrikulären Myocyten sind repolarisierende Kaliumströme, genannt "delayed rectifier", aktiv, die sich aus mehreren Komponenten zusammensetzen. Diese multiplen Komponenten werden anhand der Geschwindigkeit ihrer Aktivierung (schnell = rapid = I_{Kr}; langsam = slow = I_{Ks}) und ihrer unterschiedlichen Pharmakologie unterschieden. Die schnelle Komponente I_{Kr} wird durch Klasse III anti-arrhythmische Agentien wie D-Sotalol, Dofetilid und Clofilium blockiert. Die durch den HERG Kaliumionenkanal-Kanal vermittelten Ströme entsprechen der in isolierten Herzmuskelzellen gemessenen schnellen I_{Kr} Komponente des "delayed rectifier", wie beschrieben in:

- Lees-Miller, J. P., Kondo, C., and Wang, L. (1997). *Circ. Res.* 81: 719-723

HERG vermittelte Kaliumionenströme tragen zur Verkürzung der Aktionspotentiale bei schnellerer Herzschlagrate bei. Mutationen in IHERG verursachen eine erbliche Form der polymorphen ventrikulären Arrhythmie (torsades des pointes), auch bekannt als LQT2 Syndrom, wie beschrieben in:

- Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., and Keating, M. T. (1995). *Cell* 81: 299-307
- Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D. and Keating, M. T. (1995). *Cell* 80: 795-803
- Keating, M. T. and Sanguinetti, M. C. (1996). *Science* 272: 681-685

Ein weiteres Syndrom (LQT1) wird durch einen Defekt im Kaliumionen-Kanal Gen Kv-LQT1 bedingt, wie beschrieben in:

- Wang, Q., M. E. Curran, I. Splawski, T. C. Burn, J. M. Millholland, T. J. VanRaay, J. Shen, K. W. Timothy, G. M. Vincent, T. de Jager, P. J. Schwartz, J. A. Towbin, A. J. Moss, D. L. Atkinson, G. M. Landes, T. D. Connors & M. T. Keating (1996). *Nat. Genet* 12: 17-23

Kaliumionen-Kanal Modulatoren sind daher wertvolle pharmakologische Agentien mit therapeutischer Anwendung. Hoch-selektive Blocker (Toxine) und/oder Aktivatoren sind nur für eine relativ begrenzte Anzahl von Kaliumionen-Kanälen bekannt. Traditionell werden die meisten pharmakologisch wirksamen Substanzen und agrochemischen Produkte durch Massen-Durchmusterung chemischer oder natürlicher Banken entdeckt. Neue Substanzen werden üblicherweise in stabilen, Kaliumionen-Kanal Gene exprimierenden Säugerzelllinien getestet. Jedoch ist dieses Verfahren durch das Vorhandensein endogener Kanäle in den verwendeten Zelllinien erschwert und für biotechnologische Zwecke (homologe und heterologe Expression von Kaliumionen-Kanälen) verständlicherweise nicht geeignet. Die Nachteile zur Verwendung tierischer Zelllinien sind insbesondere:

- Die Kultivierung tierischer Zelllinien ist wesentlich komplizierter, finanziell aufwendig sowie kontaminationsanfällig.
- Homolog und/oder heterolog exprimierte Kaliumionen-Kanäle beeinflussen das Wachstum tierischer Zelllinien nicht.
- Das Vorhandensein endogener Kaliumionen-Kanäle erschwert die Auswertung der experimentellen Daten.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, diese Nachteile zu vermeiden und *Schizosaccharomyces pombe* Hefestämme als alternatives Expressionssystem zur funktionellen Expression von Kaliumionen-Kanal Genen zu entwickeln und zur Verfügung zu stellen. In der Biotechnologie besteht ein Bedarf an gut wachsenden Hefewirtsstämmen für die heterologe Expression von Kaliumionen-Kanal Genen aus höheren Eukaryonten. Insbesondere besteht ein Bedarf an stabilen Hefewirtsstämmen für die heterologe Expression von in menschlichen Krankheiten involvierten, Kaliumionen transportierenden Kaliumionen-Kanal Genen für pharmakologische Zwecke.

Diese Aufgabe wird durch einen genetisch modifizierten *Schizosaccharomyces pombe* Hefestamm gelöst, erhältlich durch die Einführung eines oder mehrerer selektiver Marker (Auxotrophie und/oder Resistenzen), der die Nukleinsäuresequenz für ein humanes erg Kaliumionen-Kanalprotein (HERG) oder ein funktionelles Derivat oder eine Mutationsform dieses Kaliumionen-Kanalproteins exprimiert, aber nicht die der Hefe eigenen TKHp oder Trk2 Kaliumionen-Transportproteine exprimiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft einen *Schizosaccharomyces pombe* Hefewirtsstamm, der Mutationen in den Kaliumtransportproteinen TKHp und Trk2 beinhaltet. Das vermutete, aber bisher nicht charakterisierte *Schizosaccharomyces pombe* Gen SPAC1F5.12 (Chromosom I, Cosmid C1F5, offener Leserahmen 12) wurde Trk2 benannt und das Genprodukt (Protein) auf seine Kaliumtransportfunktion hin funktionell analysiert. Zum Erhalt des doppelt-mutanten *Schizosaccharomyces pombe* Hefewirtsstamm wurden beide Kaliumtransportproteine sukzessive durch gezielte Gendelektion und Gendisruption ausgeschaltet. Der erzeugte doppelt-mutante Hefewirtsstamm mit Defekten in der Kaliumaufnahme zeigt Wachstumsdefekte auf Kulturmedien mit minimalen Kaliumkonzentrationen von 1 mM oder weniger. Im Vergleich zum *Schizosaccharomyces pombe* Wildstamm bedarf dieser mutante Hefewirtsstamm eines Zusatzes von mindestens 50 mM Kalium im Kulturmedium um vergleichbar gut zu wachsen.

Die selektierbaren biosynthetischen Markergene (Auxotrophiebedürfnisse und/oder Resistenzen) können durch rekombinante DNS Techniken in die Loci der Wildtyp Kaliumtransportergene eingeführt werden. Geeignete selektierbare Marker sind z. B. die Auxotrophiemarker Ura4, His7, ade2 und Leu2 oder Gene, die eine Resistenz z. B. gegen Kupfer (CUP1 Gen) oder G418 (Aminoglycosid Phosphotransferase Gen) bewirken. Solche modifizierten Allele können dann in Hefe transformiert werden, wo sie durch homologe Rekombination die Wildtyp Loci ersetzen. Die modifizierten Allele können durch Selektion auf den oder die biosynthetischen Marker ermittelt werden. Die in die Loci der Kaliumtransporter eingeführten selektierbaren biosynthetischen Marker stellen außerdem einen einfachen Weg zum Transfer dieser Mutationen in genetisch andere Linien dar (Kreuzung). Ein Stamm, der eine Mutation in einem Kaliumtransportergen (z. B. TKHp) beinhaltet, kann mit einem Stamm des entgegengesetzten Paarungstyps, der eine Mutation in einem anderen Kaliumtransportergen (z. B. Trk2) trägt, gekreuzt werden. Die Nachkommenschaft kann dann auf die Anwesenheit beider biosynthetischer Marker hin selektiert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein *Schizosaccharomyces pombe* Hefewirtsstamm der die Nukleinsäuresequenz für den humanen erg Kaliumionen-Kanal (HERG), aber nicht die der Hefe eigenen TKHp oder Trk2 Kaliumionen-Transportproteine exprimiert sowie ein Verfahren zur Detektion spezifischer Modulatoren des HERG Kaliumionen-Kanals, einschließlich:

- a) Die Behandlung des *Schizosaccharomyces pombe* Hefewirtsstamms, der die Nukleinsäuresequenz für den humanen erg Kaliumionen-Kanal oder ein funktionelles Derivat oder eine Mutationsform dieses Kaliumionen-Kanals aber nicht die der Hefe eigenen TKHp oder Trk2 Kaliumionen-Transportproteine exprimiert mit Testsubstanzen.
 b) Wachstumsbestimmungen in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz.
 c) Messungen des Anstiegs oder der Abnahme des Kaliumtransportes derjenigen Stämme in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz.

Dieses Verfahren ist zur Identifizierung spezifischer Modulatoren des HERG Ionenkanals geeignet.

Der Wachstumsdefekt des mutanten *Schizosaccharomyces pombe* Hefewirtsstamms kann zur Isolierung und Anreicherung von Kaliumionen-Kanalgenen aus Genbibliotheken (z. B. humane cDNA Bibliotheken) verwendet werden, wenn die exprimierten Gene die Mutationen in dem doppelt-mutanten Hefewirtsstamm komplementieren und ein Wildtypphänotyp hinsichtlich der benötigten Kaliumkonzentration resultiert. Damit können Kaliumionen-Kanäle identifiziert werden, die zwar physiologisch beschrieben, aber bisher noch nicht isoliert wurden. Alternativ können verschiedene Kaliumionen-Kanäle in die Doppel-Mutante eingeführt werden, um zu testen, ob der Wachstumsdefekt auf Kalium limitierten Medien komplementiert wird. Der *Schizosaccharomyces pombe* Wildtypphänotyp kann durch Auswahl derjenigen Stämme, welche nach Transformation, Selektion und nach Anzucht unter Bedingungen von 10 mg/l Kalium im Kulturmedium ermittelt werden.

Jede dieser Anwendungen resultiert in einem Hefestamm, der heterolog einen fremden Kaliumionen-Kanal exprimiert und zur Durchmusterung von Modulatoren des betreffenden Kaliumionen-Kanals verwendet werden kann. Ein Hefestamm, der heterolog einen fremden Kaliumionen-Kanal exprimiert, kann in einfachen Verfahren zur Durchmusterung verschiedener Testsubstanz-Bibliotheken verwendet werden. Diese einfachen Verfahren, in denen Wachstumsveränderungen oder gesteigerte und/oder verminderte Kaliumaufnahme durch Agarplattentests und/oder in Flüssigkultur beobachtet werden kann, können somit spezifische Substanzen detektieren, die die Kaliumionen-Kanal Funktion modulieren. Zur Durchmusterung auf Aktivatoren einer Kaliumionen-Kanal Funktion kann das Durchmusterungsverfahren solche Veränderungen wie metabolische Aktivität, gesteigerte Wachstumsrate oder gesteigerte Kaliumionen Aufnahme beinhalten. Zur Durchmusterung auf Inhibitoren einer Kaliumionen-Kanal Funktion kann das Durchmusterungsverfahren solche Veränderungen wie verminderte Wachstumsrate oder verminderte Kaliumionen Aufnahme beinhalten. Die Testsubstanzen, die im Verfahren zur Detektion spezifischer Modulatoren eingesetzt werden, können z. B. synthetische oder natürliche Produkte sein. Natürliche Produkte beinhalten pflanzliche, tierische oder mikrobielle Extrakte.

In Fig. 1 ist eine schematische Darstellung der genomischen Fragmente, die die Wildtyp TKHp und Trk2 Loci enthalten sowie die entsprechenden mutierten Allele *trk1::LEU2*, *trk2::Ura4* und *trk2::adhHerg/Ura4* dargestellt. Die TKHp und Trk2 kodierenden Regionen sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Die mutanten Allele wurden zum Ersatz der entsprechenden Wildtyp Loci in *Schizosaccharomyces pombe* Stämme transformiert.

In Fig. 2 ist die abgeleitete Aminosäure- (SEQ. ID. NO. 2) und die Nukleinsäuresequenz (SEQ. ID. NO. 1) des *Schizosaccharomyces pombe* Kaliumtransportproteins TKHp dargestellt. Die durch Unterstrich hervorgehobene Region entspricht der deletierten und durch den biosynthetischen Marker LEU2 ersetzten Sequenz.

In Fig. 3 ist die abgeleitete Aminosäure- (SEQ. ID. NO. 4) und die Nukleinsäuresequenz (SEQ. ID. NO. 3) des *Schizosaccharomyces pombe* Kaliumtransportproteins Trk2 dargestellt. Die durch Unterstrich hervorgehobene Region entspricht der Eco RV Stelle, in die der biosynthetische Marker Ura4 eingeführt wurde.

In Fig. 4 ist die Nukleinsäure- (SEQ. ID. NO. 5) und abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ. ID. NO. 6) des humanen erg Gens (HERG) dargestellt. Die Sequenz entspricht der in der Originalpublikation von Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetzky, B. and Robertson, G. (1995). Science 269: 92-95 beschriebenen.

In Fig. 5 ist das Wachstum der erzeugten *Schizosaccharomyces pombe* Kaliumtransport defekten Mutanten in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration im Kulturmedium gezeigt. Die Stämme wurden auf Vollmedium, pH 4.5 bei 30°C über Nacht angezogen und anschließend auf 100 mM, 10 mM und 1 mM Kalium enthaltende Agarplatten replika-plattiert. Die Platten wurden bei 30°C für zwei Tage inkubiert. Der *Schizosaccharomyces pombe* Hefestamm mit Defekten in beiden Kaliumtransportproteinen (Doppel-Mutante) wächst unter Bedingungen von 1 mM Kalium im Medium nicht.

Fig. 6 zeigt das Wachstum vom *Schizosaccharomyces pombe* Wildstamm, der Kaliumtransport Doppel-Mutante sowie den modifizierten Hefestamm, der das humane erg Gen (HERG) exprimiert auf 100 mM, 10 mM und 1 mM Kalium enthaltenden Agarplatten. Die Platten wurden bei 30°C für zwei Tage inkubiert. Im Gegensatz zur *Schizosaccharomyces pombe* Kaliumtransport Doppel-Mutante ist der das humane erg Gen (HERG) exprimierende Stamm in der Lage, auf 1 mM Kalium im Medium zu wachsen.

In Fig. 7 ist die Wirkung bekannter Inhibitoren des HERG Kaliumionen-Kanals dargestellt. Der HERG exprimierende modifizierte *Schizosaccharomyces pombe* Stamm wurde auf Vollmedium, pH 4.5 bei 30°C über Nacht angezogen und anschließend auf 1 mM Kalium enthaltende Agarplatten in der Gegenwart von 1 mM Barium, 1 mM Cäsium und 40 µM Lanthan replika-plattiert. Durch die Inhibierung des heterolog exprimierten Gens kann der modifizierte *Schizosaccharomyces pombe* Stamm mit Defekten in beiden Kaliumtransportproteinen nicht mehr wachsen.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

Beispiele

Allgemeine Methoden

Rekombinante DNA Technik

Zur Anreicherung und Manipulation von DNA wurden Standardmethoden benutzt, wie sie bei Sambrook, J. et al., In: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989), beschrieben sind. Die verwendeten molekularbiologischen Reagenzien wurden nach den Angaben der Hersteller einge-

setzt.

Hefetransformation

Schizosaccharomyces pombe Stämme wurden entsprechend der Methode, wie sie von Moreno, S. et al., (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Methods in Enzymology 194: 795-824, beschrieben sind, transformiert.

Beispiel 1

1.1 Konstruktion der Schizosaccharomyces pombe Mutante tkh

Die Mutation in dem Schizosaccharomyces pombe Kaliumionen-Transporter TKHp wurde in dem Plasmid pL61SPT1, das die kodierende Nukleinsäuresequenz mit 2958 Basenpaaren (bp) für diesen Transporter enthält, wie beschrieben in Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J. D., Heyer, M., Höfer, M. (1996). J. Membrane Biol. 152: 169-181, durchgeführt.

In dem Gen wurde eine 1102 bp Deletion in der kodierenden Region durch Spaltung mit der Restriktions-endonuklease Hind II eingeführt. Die DNS Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese getrennt und das größere Fragment (6684 bp), das die restlichen Transportersequenzen sowie Vektoranteile enthielt isoliert und gereinigt. Zum Erhalt einer Deletions/Insertionsmutation wurde das L1:U2 Sma I/Hind II Gen aus Saccharomyces cerevisiae als biosynthetischer Marker durch Ligation mit dem TKH Restfragment eingeführt. Das resultierende mutante Allel tkh::LEU2 (Fig. 1) wurde als lineares Not I Konstrukt zur Transformation des Schizosaccharomyces pombe Wildstammes h⁻ ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 verwendet. Die Auswahl erfolgreich transformierter Kolonien erfolgte durch die Selektion auf Leucin Prototrophie. Die Bestätigung der durch homologe Rekombination eingeführten Mutation im Kaliumtransporter TKHp erfolgte durch Restriktionsspaltung genomischer Schizosaccharomyces pombe DNS und Southern blot Hybridisierung, wie beschrieben in Sambrook, J. et al., In: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Der durch Mutation des Schizosaccharomyces pombe Kaliumtransporters TKHp resultierende mutante Phänotyp (Genotyp h⁻ ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 tkh::LEU2) wächst im Vergleich zum Wildstamm auf Kalium limitierten Medien gleich gut (Fig. 5). Daher wurde die Aktivität eines weiteren spezifischen Kaliumtransporters in dieser Schizosaccharomyces pombe Mutante postuliert.

1.2 Konstruktion der Schizosaccharomyces pombe Mutante trk2

Zur Konstruktion der Schizosaccharomyces pombe Mutante trk2 wurde mit den Oligonukleotiden SpTRK2#5 5' CAC GGA TCC ACA GAT TTT ATC ATG CAG TTA TCG GGT TTT TCT ACA AAC GGT TCC 3' (SEQ. ID. NO. 7) welches der 5' kodierenden Region des Start-Codons ATG entspricht (Position -21 bis +33), und SpTRK2#H3 5' CGC GAA AGA AGC TTG GGC GA 3' (SEQ. ID. NO. 8) welches komplementär zur 3' kodierenden Region der Hind III Restriktionsstelle an Position 625 ist (Position +593 bis +612), ein 625 bp langes Fragment durch die Polymerase-Ketten-Reaktion aus genomischer DNS der Schizosaccharomyces pombe Mutante h⁻ ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 tkh::LEU2 amplifiziert. Nach Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI und Hind III wurde dieses Fragment mit dem entsprechend gespaltenen bakteriellen Plasmidvektor pBSKII (Firma Stratagene, Heidelberg) ligiert. Im resultierenden Plasmid pBT2 wurde durch Sequenzierung das 625 bp Teilfragment des Kaliumtransporters Schizosaccharomyces pombe Trk2 bestätigt. Das erhaltene Konstrukt wurde durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease Eco RV an Position 246 im Trk2 Genfragment linearisiert und das die Disruptions/Insertionsmutation durch Ligation des Ura4 Sma I/Hind II Gens aus Schizosaccharomyces pombe als biosynthetischer Marker eingeführt (Fig. 1). Das gewünschte Plasmid (pBT2URA), das das mutante Allel trk2::Ura4 enthält, wurde durch Restriktionskartierung und Polymerase-Ketten-Reaktion mit den o. g. Oligonukleotiden als 2.3 kb Fragment bestätigt. Das erhaltene mutante Allel trk2::Ura4 (Fig. 1) wurde als lineares Bam HI/Kpn I Konstrukt zur Transformation des Schizosaccharomyces pombe Wildstammes (h⁻ ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31) verwendet. Die Transformation des Wildstammes führte zum Erhalt einer Schizosaccharomyces pombe Mutante in der singulär der Kaliumtransporter Trk2 (Genotyp h⁻ ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 trk2::Ura4) disruptiert ist. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf die Uracil Prototrophie hin. Die Bestätigung der durch homologe Rekombination eingeführten Mutation im Schizosaccharomyces pombe Kaliumtransporter Trk2 erfolgte durch Southern blot Hybridisierung.

Nach Mutation des Schizosaccharomyces pombe Kaliumtransporters Trk2 wurde der resultierende mutante Phänotyp (Genotyp h⁻ ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 trk2::Ura4) im Vergleich zum Wildstamm-Phänotyp und der Kaliumtransporter Mutante tkh getestet (Fig. 5). Die singuläre Mutation des Kaliumtransporters Trk2 zeigte im Vergleich zum Wildstamm und der Kaliumtransporter Mutante tkh auf Kalium limitierten Medien gleiches Wachstum.

1.3 Konstruktion der Schizosaccharomyces pombe Doppel- Mutante tkh trk2

Das erhaltene mutante Allel trk2::Ura4 (Fig. 1) wurde als lineares Bam HI/Kpn I Konstrukt zur Transformation der Kaliumtransporter Mutante tkh (h⁻ ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 tkh::LEU2) verwendet. Die Transformation Mutante tkh führte zum Erhalt einer Schizosaccharomyces pombe Doppel-Mutante in der beide Kaliumtransporter TKHp und Trk2 (Genotyp Mutante (h⁻ ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 tkh::LEU2 trk2::Ura4) deletiert und disruptiert sind. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf die Leucin und Uracil Prototrophie hin. Die Bestätigung der durch homologe Rekombination eingeführten Mutation im Schizosaccharomyces pombe Kaliumtransporter Trk2 erfolgte durch Southern blot Hybridisierung.

Die Bestätigung, daß Trk2 der gesuchte weitere Schizosaccharomyces pombe Kaliumtransporter ist, erfolgte durch Ausplattierung des erzeugten Hefestamms im Vergleich zum Wildstamm und der Kaliumtransporter Mutante tkh auf Kalium limitierten Medien (Fig. 5). Der Phänotyp der Kaliumtransporter Doppel-Mutante tkh trk2 ist dadurch gekennzeichnet, daß Zellen dieses Hefestamms auf Konzentrationen kleiner 1 mM Kalium im Kulturmedium nicht lebensfähig sind.

1.4 Konstruktion des HERG exprimierenden Schizosaccharomyces pombe tkh trk2 Stammes

Das Gen für den humanen erg Kaliumionen-Kanal (HERG) wurde durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI und Eco RI als 3.5 Kilobasenpaar (kb) Fragment aus dem Plasmid pcDNAHERG (erhalten von Dr. G. Robertson, University of Wisconsin, Madison, USA) und Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese erhalten.

Zur Transkription eines humanen Gens in der Hefe Schizosaccharomyces pombe ist ein Hefe-eigener Promotor notwendig. Der in Schizosaccharomyces pombe konstitutiv aktive adh Promotor (Alkohol Dehydrogenase Gen) wurde als Sal I/Bam HI Fragment aus dem Plasmid pEVP11, wie beschrieben in Moreno, S. et al., (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Methods in Enzymology 194: 795-824, nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese isoliert. In einer Dreifach-Ligation wurden die adh Sal I/Bam HI und HERG Bam HI/Eco RI Fragmente mit dem Sal I/Eco RI gespaltenem Plasmidvektor pBSKII ligiert. Das gewünschte Plasmid pBSKadhHerg wurde durch Restriktionskartierung bestätigt. Aus diesem Plasmid wurde ein 4.6 kb adhHerg Verbundfragment durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen Hinc II und Xba I und nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese erhalten. In diesem Verbundfragment wurden die überstehenden Nukleotidenden der Xba I Stelle durch DNS Polymerase I aufgefüllt.

In dem Plasmid pBT2URA (siehe 1.2), welches das mutante Allel trk2::Ura4 enthält, wurde mit der Restriktionsendonuklease Eco RI eine Linearisierung an Position 251, direkt vor dem Ura4 Gen durchgeführt, die überstehenden Nukleotidenden der Eco RI Stelle durch DNS Polymerase I aufgefüllt und durch Alkaline Phosphatase dephosphoryliert. Dieses linearisierte Fragment wurde mit dem 4.6 kb adhHerg Verbundfragment ligiert (Fig. 1). Das gewünschte Plasmid wurde Restriktionskartierung identifiziert. Das erhaltene mutante Allel trk2::adhHerg/Ura4 (Fig. 1) wurde als lineares Xba I/Kpn I 7.0 kb Fragment nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese zur Transformation der Kaliumtransporter Mutante tkh (h^- ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 tkh::LEU2) verwendet. Die Transformation dieser tkh Mutante führte zum Erhalt einer Schizosaccharomyces pombe Doppel-Mutante, in der der Kaliumtransporter TKIIP deletiert ist und der Kaliumtransporter Trk2 durch die stabile Einführung des humanen erg Gens (HERG) disruptiert ist. Anstelle des Kaliumtransporters Trk2 wird in diesem Schizosaccharomyces pombe Stamm (Genotyp h^- ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 tkh::LEU2 trk2::adhHerg/Ura4) der HERG Kaliumionen-Kanal exprimiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf die Leucin und Uracil Prototrophie hin. Die Bestätigung der durch homologe Rekombination eingeführten stabilen Integration des humanen erg Gens (HERG) an den Schizosaccharomyces pombe Trk2 Locus erfolgte durch RNS Analyse.

Die Expression des HERG Kaliumionen-Kanals den restauriert Phänotyp der Kaliumtransporter Doppel-Mutante tkh trk2 auf Kalium limitierten Medien (Fig. 6). Durch Expression des HERG Kaliumionen-Kanals können Zellen dieses genetisch modifizierten Hefestamms im Gegensatz zur Doppel-Mutante tkh trk2 auf Konzentration kleiner 1 mM Kalium gut wachsen. Die Restaurierung des Wildtyp Phänotyps ist abhängig von der heterologen Expression des HERG Kaliumionen-Kanals, wie anhand der Inhibierung von HERG auf 1 mM Kalium enthaltenden Agarplatten in der Gegenwart von 1 mM Barium, 1 mM Cäsium und 40 μ M Lanthan bestätigt (Fig. 7). Durch die Inhibierung des HERG Kaliumionen-Kanals kann der Schizosaccharomyces pombe Stamm mit Defekten in beiden Kaliumtransportproteinen auf der 1 mM Kaliumkonzentration nicht mehr wachsen.

1.5 Wachstumstests auf Kalium limitierten Medien

Kulturen von Schizosaccharomyces pombe Wildstamm, der Kaliumtransport defekten Mutanten tkh, trk2 und tkh trk2 und dem HERG exprimierenden Stamm wurden im Vollmedium YEP (2% yeast extract, 1% peptone) mit 2% D-glucose, pH 4.5 bei 30°C über Nacht unter Schütteln angezogen. Serielle Verdünnungen wurden auf Vollmedium-Agarplatten ausgestrichen, bei 30°C über Nacht inkubiert und auf selektive Agarplatten (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% NH_4SO_4 , 2% D-glucose, pH 4.5) mit 100(A), 10(B) oder 1(C) mM KCl replika-plattiert. Diese Platten wurden für 48 Stunden bei 30°C inkubiert.

1.6 Wachstumstests in Gegenwart von Inhibitoren

Kulturen von Schizosaccharomyces pombe Wildstamm, der Kaliumtransport defekten Mutante tkh trk2 und dem HERG exprimierenden Stamm wurden im Vollmedium YEP (2% yeast extract, 1% peptone) mit 2% D-glucose, pH 4.5 bei 30°C über Nacht unter Schütteln angezogen. Serielle Verdünnungen wurden auf Vollmedium-Agarplatten ausgestrichen, bei 30°C über Nacht inkubiert und auf selektive Agarplatten (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% NH_4SO_4 , 2% D-glucose, pH 4.5) mit 1 mM KCl und 1 mM Barium (A), 1 mM Cäsium (B) und 40 μ M Lanthan (C) replika-plattiert. Diese Platten wurden für 48 Stunden bei 30°C inkubiert.

Publikationsliste

- Adelmann, J. P., Bond, C. T., Pessia, M. and Mylie, J. (1995). Episodic ataxia results from voltage-dependent potassium channels with altered functions. Neuron 15: 1449-1454
- Balcells, L., Calero, F., Gomez, N., Ramos, J. and Arino, J. (1999) The Schizosaccharomyces pombe Pzh1 protein phosphatase regulates Na^+ ion influx in a Trk1-independent fashion. Eur. J. Biochem. 260: 31-37
- Curran, M. E., Splaski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D. and Keating, M. T. (1995). A molecular basis for

- cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80: 795-803
- Gaber, R. F., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1988). TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2848-2859
- Keating, M. T. and Sanguinetti, M. C. (1996). Molecular genetic insights into cardiovascular disease. *Science* 272: 681-685
- Ko, C. and Gaber, R. F. (1991). TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4266-4273
- Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J. D., Heyer, M. and Höfer, M. (1996). The SpTRK gene encodes a potassium-specific transport protein TKHp in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Membrane Biol.* 152: 169-181
- Lees-Miller, J. P., Kondo, C., and Wang, L. (1997). Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K⁺ channel in mouse and human hearts. *Circ. Res.* 81: 719-723
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology* 194: 795-824
- Rodriguez-Navarro, A. and Ramos, J. (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159: 940-945
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) In: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., and Keating, M. T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* 81: 299-307
- Wang, Q., M. E. Curran, I. Splawski, T. C. Burn, J. M. Millholland, T. J. VanRaay, J. Shen, K. W. Timothy, G. M. Vincent, T. de Jager, P. J. Schwartz, J. A. Toubin, A. J. Moss, D. L. Atkinson, G. M. Landes, T. D. Connors & M. T. Keating (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12: 17-23

1. Allgemeine Information

a) Anmelder: Dr. Hella Lichtenberg-Frate

b) Titel: *Schizosaccharomyces pombe* Hefewirtsstämme mit Defekten in der Kaliumaufnahme

c) Anzahl der Sequenzen: 8

d) Korrespondenzadresse: Dr. Hella Lichtenberg-Frate, Botanisches Institut, Kirschallee 1, 53115 Bonn

2. Information zur SEQ ID NO.1

a) Sequenzcharakteristika

1. Länge: 2958 Basenpaare

2. Typ: Nukleinsäure

3. Strang: Einzelstrang

4. Topologie: linear

b) Molekültyp: cDNS

c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.1

SQ SEQUENCE 2958 BP; 824 A; 577 C; 551 G; 1006 T; 0 OTHER;

AAAGAAGACG CGATTTTACG TTGTATTATA AGAGAGGAAT CCTCAAGTAT TGTTGAAAGG

AATCGTCAA GATTGGGTAA AAATGTCGTT TGTCATTTGT CATAATTCCC TTTTAGAAAT

TTAGTGGTTT CCTCATCAGT ATCGCTTTTA CCCGTAGATT TCAAACTAA TTGCTTCTTA

TCTTGTCAT AGTTAAGGAT TTCCGTAAAC TTCAAACCAA TTTCTCTGTT TCTTGTTCTG

TTGTTGGTGG GTTTGGCTGG AACTATTGAC TAAAATAAAT GGTCCTAAAT TACATTCAA

GATGGTTCAA GTGGGTGATA CCAACTTTTG GATTCAAGGC AATTCATTAT ATTTACATAT

ATCCTTAACT ATCATTGCCT CTGTCCTACT TTTTACCGGA GGGACCACCA CGAAAATCAA

GTATATCGAT GCTTTATTCT TAGCTAGCAG CGCAACTACC CAAACAGGCC TTAACAGTGT

TGACTTAAAT TCTTTATCTA TCTGGCAGCA GTTTATCCTG TATGGATTTA CTGCTATTAC

GGTTCCTATA TGGATGCACG GAAGTATTTT CTTTCATCCG CTGTATTGGT TTCGACGAAA

ATTTAAAGAC GTTGTTTCGTC AAAATCGTAC TCGAAAATTT CAGAGAAAGC TCCGTAAAG

CTTAATGAAA AAAAGCGAGG ATGACGAAGA ACAGGGTGTT CGTGGTAGAA AAATTCGTGT

AATGTTACCA TACCTACATT CACTAAGGAG TCCAACGTCT CTAAAAAAT TCTCGAGATT

TGACACGCAT GACAGTACGA ACAATCCGTA CTTTCCTGAC AACCCCCCTT CTCCCAAGGC

AGATATATCT AAAGACGAGT ATTTTGGAAA GTATCTCCCA AAAAAGTCTG ATACGCTAGA

CATGGATTTG GAAAGTCACA ACATGACTTT TCATGACTAT GAACCTTCCA TTGAAAATAA

AAATTACGAT TTTGGTAGTT CGCATTACAG CTCGATGCAA ATGTATGAAA TGGATGACCT

TCATCCCCGA CTTTCGTAGAC AAAGCTCTTT TATTTCTCTC GTTAATCCTT TAGAGGCTGA

CTACACCCGT GAAACTTTAT CTGAAGGCGC CTTAGTTCAG GAATCTCTCC CTATGGCTTA

TAGTTATTCT GATACTAATT TGGTTGTATC GAGGGATTCA TTACTCTCA CTGGGGACGA

CAATCTTTTC CCAGAAGGTG GTTTAAGGCC TGCCAATACA ATAGACGGAA TAGTAAGGTC

GTCTCTGTCT TCTTCTCTCC TATCTAAAGA CACTGAACCA TCGACAGTTG ACATGCATAT

TGCTTTTACC GGACTTAATA AGCCCACCAT AGAGCGTGAA CGTAATCTTA AACTAAGAAA

AAAAAGTCGT TTTTATAAAA AATCTTTACG TTCCAGATTT TCGCGAGGAC TTCATCGTCC

AATACGTTGG ACAAAGTCAT TCACTTCTAA CCGACGAAAC TTGACTCTTG AACGAGTCCT

TTCTTCTGCC TTTGCTAAAA AACATGAGCC TTCTATTTCA TCAAGACACA CTACTATGTC

ACTTCCCTAT TTGTCGTATA ATCCTACTGT CGATCGTAAT TCTGCTTTTC TTGCTTTGTC

TAAAGAACAG CGGGACGAGC TGGGTGGAAT TGAATATAGA GCTTTGAAAT GCGTCTGCTC

CATGGTTATC CTTTATTTTA TCATTTTAA TATTGCTGCC TTTGTGACCT TCATTGTTTT
TGCTTATACG GCAGTGGGAT CGCGAGAGGT AATAGATTCT TATGACTTAC GTCGTGGGTG
GTGGGCGTTA TTCTCGTCTG CTTCTTCATT TAATGATTG GGGTTTTCTT TAATACCATC
GTCTTTTGTG CCAATGAATC GAAACATTTT TCTTTTGTG ATTTTCATCTT TATTTCATTAT
CGCAGGTAAC ACGGGATTCC CTTGTTTTTT TAGAACATTC ATTTGGACAA CGTATAAGCT
ATACCCTTTT AGTTTTGAGA AGAAAGAAGC TATGGCATTTC CTCCTTGATC ATCCTCGACG
ATGTTTCACT TTATTGTTTC CATCTGGAGC AACCTGGGTC TTGTTTTTTG TTTTGCTGCT
GCTTAATGTC ATTGATCTGG TATTGTTTCAT GGTCTTAGAT ACTGGAAGTA AAGCAGTCGC
TAGCCTTCCT AAAGGTATTA GGGTTGTAAA TGCAATATTT CAATCAGTTT GTACAAGAAC
CGCAGGATTC ACGAGTGTAT CAATTAGTGA ACTTCACCCA GCAGTACTGG TCAGTTACAT
GGTTATAGTC TATATTTCTG TTTATCCAGT TGCTATCAAC ATGAGAAATA CCAATGTTTA
TGAGGAGCGA TCTTTGGGTG TTTACAGAAC TGAAGATGAT GAGGGGAAAT CTTTCTTAAA
AGATCACCTT ACTGAACAAT TAAGTTACGA TTTATGGTAT ATTTTCTAG GGCTATTCAT
CATATGCATT TGTGAAGGAG GTAAAATCTC CAATCCTCTA GATACCGATT TCAGTATTTT
TACTGTCCTT TTTGAAGTAG TCTCTGCTTA CCGTACGGTG GGACTTAGTA CTGGATTAAG
CTCCTCAAAT TGTTCACTTT CAGCAAGATT TACTACTATA AGTAACTAG TTATTATAGC
ACTTGAAGTG CGCGGTAGAC ATAGAGGTTT ACCCAGGGCT GTTGACGAG CCATCCTTCT
TCCTTCTGAA AAAAATAATC TGAAAGAAGA AGAAGATTAT CAACGTCGTC ACGGATTTTC
CATAGACAAC GCACGTGGCA GTATTGCAGT TTCTCGAGAC TGATATTTCT TATCACGATC
ATGTATTATA TTTGTAAATT ATATCATCTA ATAAATAGTA CTCCGCTAAA TTTCATACTC
CTGATCGATA CACCGTTTGT CCGCCATTTC TGAGTTGAAT TGTTTCCTTC GACGAAAGAA
TTTGTAAGC CATTCTA

3. Information zur SEQ ID NO.2

a) Sequenzcharakteristika

1. Länge: 841 Aminosäuereste
2. Typ: Aminosäure
3. Strang: kodierend
4. Topologie: linear

b) Molekültyp: Protein

c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.2

FT CDS 302..2803
FT /NOTE="NCBI GI: 550526"
FT /CODON_START=1
FT /PRODUCT="K+ TRANSPORTER HOMOLOGUE"
FT /DB_XREF="PID:G550526"
FT /DB_XREF="SWISS-PROT:P47946"
FT /TRANSLATION="MVQVGDTNFWIQNSLYLHISLTIIASVLLFTGGTTTKIK
FT FLASSATTQTGLNSVDLNSLSIWQQFIFYGFTAITVPIWMHGSISFIRLYWFR
FT VRQNRTRKFQRLRKLKSLMKKSEDEEQVGRKIRVMLPYLHSLRSPTSLKNFS
FT DSTNNPYFPDNPSPKADISKDEYFGKYLPKKSDTLMDLESHNMTFHDYEPSI
FT DFGSSHSASMQMYEMDDLHPRLRRQSSFISVNPLEADYTRETLSEGALVQESL
FT YSDTNLVVSRDSFTLTGDDNLFPEGGLRPANTIDGIVRSSLSSSSLSKDTEPST
FT AFTGLNKPTIERERNLKLKKSRFYKSLRSRFSRGLHRPIRWTKSFTSNRRNL
FT LSSAFAKKHEPSISSRHTTMSLPYLSYNPTVDRNSAFVALSKEQRDELGGIEYR
FT CSMVILYFIIFNIAAFVTFIVFAYTAVGSREVIDSYDLRRGWALFSSASSFND
FT IPSSFVPMNRNIFLLLISSLFIIAGNTGFPCFFRTFIWTTYKLYPFSFEKKEAM
FT HPRRCFTLLFPSGATWVLFVLLLLNVIDLVLFMVLDTGSKAVASLPKGI R VVN
FT VCTR TAGFTSVSISELHPAVLVSYMMYISVYPVAINMRNTNVYEERSLG VYR
FT GKSFLKDHLTEQLSYDLWYIFLGLFIIICICEGGKISNPLD TDFSIFTVLFEVVS
FT GLSTGLSSSNCSLSARFTTISKLVIIALELRGRHRLPRAVVRAILLPSEKNNL
FT YQRRHGFSIDNARGSI AVSRD"

4. Information zur SEQ ID NO.3

a) Sequenzcharakteristika

1. Länge: 2806 Basenpaare
2. Typ: Nukleinsäure
3. Strang: Einzelstrang
4. Topologie: linear

b) Molekültyp: cDNS

c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.3

ID	SPTRK2	PRELIMINARY;	DNA;	2806 BP.
SQ	SEQUENCE	2806 BP;	828 A;	550 C; 540 G; 888 T; 0 OTHER;
15	ATACAGATTT	TATCATGCAG	TTATCGGGTT	TTTCTACAAA CGGTTCCGGT TCCTTGAATA
	CCATTGTATG	TGAAAACTT	CTTTTCAAGC	CTAACTTTGT TCAAGATTCT TTTATAATAG
	GAATGACTAT	TTTATGTTCA	GTAATATTGT	ATGGGTCGGG AAATTTGCGC TACATAGATG
	CTTTGTTGTT	GGCTTCTGGT	TCTTGTA	CTC AGACTGGCTT GCAGCCTGTG GACCTCACGC
20	AGATATCCAT	TTACCAACAG	TTAACTATT	TCCTTTTGG AGTTTGTAGT ACACCAATTA
	CTGTGAACCT	GGGCTTGACT	TTGTTTAAAGC	TGTACTTCTA TAACAAGCGA TATGACATGG
	TCATAACAAA	TAATAAACTT	AGGATGACAT	ATACTTATCA CACTGTAAGA AGAAGGGATA
	CTCCAGAGCC	TTCCAAAGTT	GGCAATCGAA	AAATTCGGGT TTTGTTAGAC CAGGGTAATC
	AAATGCACCG	GCCAGTTGCC	CCAGAGACTA	AGGCTGAGGA AGCTGAACAC CAAGAGAATG
25	AAAAACATCA	CAGGCACCAT	TTTCGTCTAA	GGAAATTTGC TAATGCAATC GATCGCCCAA
	GCTTCTTTTCG	CGGGAATACC	ATGCCCGCTC	TCCCTAGTTA TGCAGGTGTT AGAAATTCTC
	AAGAAAATGA	AGACAGAACT	GAAGCATTA	GTCCAGCTCT TGGGAAACGA AGAATGGCAT
	CAATCGACAA	TGGATCTTTA	TCCGTTGTAC	AAAACAATGC TAGAAATAAT CCTGTCGACT
30	TTTACATTCC	TAGTTCGTTT	GAAGAATCAT	CTTTTCAAAC AATTCCTGAG GATTTTGAGC
	CTCAAGTACA	TGACCACGAG	AATCAAACAC	AACTGAACCA TCATCTGGAT AACAACAGTT
	CTATCTCTTC	GCACAATCCT	TCCCTAGAAA	CTGCAAATGA TGGTAATCAG GAAACTGTTT
	CATCCTCAAA	CTCAAACACT	AGCACAACAA	GAGTTGACAA TGATCCACAT GTAGCATCTT
	ATTCACCTCA	AAATTCGAAT	TTTGATCATC	AGGCTGCTGC AACTACTAAC GATGCACATC
35	AAAATGTAGT	ACGCGGCTCT	GCAATTACCA	TTGCACCAAC CCCTGTTCCC AGGCATAATC
	GCAGGCCTAT	ATATTTTGCT	GATGACACGA	ATGGAGCTGA GCAGGAAAAA GGTGCTCATC
	GACTTGATGG	ACGAGGTAGA	AAACGTGGTA	AATCATTGTC TGTTACACCT ACACCTCACA
	GGAATGAGCG	CTCAATGTCT	GTCCTACCAT	TTCAATTAGC CAAATCATTT ACATCTGCTC
40	TTCTCTGAAG	ACTCACATTC	AACCGTACTC	ACACGAAAGC TAGCACAATG AGTTTACCTT
	ATTTATCGTA	CAATGCAACA	GTGGGCAGAA	ATTCTGCATT TTATGCCTTA ACTCCAGTGG
	AGAGAGAAGA	ATTGGCGGGA	ATTGAATATG	AATCTCTCAG GATATTGACT GTCATATTAG
	TGGTTTATTT	TCTGTTTGG	CATATTCTTG	GTTTGGTTGC GTTCCTAATA TTCATTTATA
	CTGCTAAAC	ATCCGGTCGT	GTAGTTACGG	ACGGCGGTAT AAATAGAGGC TGGTGGGCAG
45	CGTTTACTTC	TAGTTCGCTG	TTTGATAATC	TAGGCTATTC GTTGAACAGC GATTCTTTAA
	ATTCTTTTCA	AAAAAGCCATA	TTCCCTCAGG	TTCTTGGAAC TATTCTGATA TTTTATAGGA
	ATACTTTCTT	TCCAATTATG	CTCCGGTTTA	TAATTTGGAT TATGATACGA ACAACGAGAT
	TTTCGCCTAA	TTCCAGCAA	GCTTTGTACT	TTCTTTTCGA ACACCCTCGA CGAAGTTTAA
50	CTCTTCTGTT	TCCTTCAAAA	ACTACTTGGG	TGCTTTTTTTT AAATTTAACT TTATTGAATT
	TTGCTTCCTT	TTTCTTTTTT	ATGGTTTTAG	ACTTGGGTAA TTCATATGTT GACAAAATTC
	CAGTTGGTTA	TCGAATTATG	AATGCTATAT	TTCAAAACGC AGCTACACGT TCTGCTGGCT
	TTACGGTGGT	TGATTTAAGC	CAAATTGCTC	CGGCAGTAAT GGTGACCTAC ATGTTTATGA
55	TGTATATCTC	TGCCTATCCA	ATCGCAATGA	GTATTCGACA AACTAATGTT TACGAGGAAC
	GTTCTCTTGG	AATATATGCA	GCAGACACCG	AAAATGATGA TGATAATAAT ATTAATAATA
	ATAATAATGA	TAATAATACG	CCGAAAAGGA	AAAATTTTTT GATGGACCAT ATACAAAGGC
	AACTGAGTCA	CGATTTGTGG	TATTTATTCC	TAGGCTACTT CATAATTACT ATAGTCGAAG
	GTCGTCGATT	AGAGTCGGAA	GCGGAACCGC	AATTTACGCT TTTTGCTATT TTATTGAGG
60	TGATTTACAGG	CTATGGCACT	GTGGGCCTAA	GCTTAGGGTA CAAAAATGAT CCTTCGCTTA
	CGGCTCAGTT	TCGGAAAATT	AGCAAACCTG	TTATGGTTGC ACTACAGATT CGTGGACGAC
	ATAGAGGACT	TCCAAGTGCA	TTAGATAGAG	CAGTGCTAAT GCCTTCGGAT AAAAATTTTG
	ACCGGGAAGA	AGAGGATTAT	ATGAGACGTC	ACGGGAAAAA AAATACTAAT AGAGCAGACC
	CGGTACCCAG	TTCTTAATGA	TTATAACCTC	ACGGTTGATT AGACTTACTT TCTATGAAAA
65	TGCAAGGCAA	GGTCAGGAGC	TAATGAAACT	TGTAAGTAT CTTCTGGTTC TGTGCCATTT
	TAAGTGATTG	GGCCTTAAAA	GAACCTTTTTG	TTTTATTTTA TTTTAC

5. Information zur SEQ ID NO.4

a) Sequenzcharakteristika

1. Länge: 880 Aminosäurereste
2. Typ: Nukleinsäure
3. Strang: kodierend
4. Topologie: linear

b) Molekültyp: Protein

c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.4

ID SPTRK2 PRELIMINARY; PRT; 880 AA.
 DT 01-NOV-1997 (CREATED BY PC/GENE PROGRAM TRANSL)
 DE SCH POMBE
 OS SPTRK2 OHNE INTRONS
 CC TRANSLATED FROM DNA SEQUENCE SPTRK2 (BASES 15 TO 2654).
 SQ SEQUENCE 880 AA; 99848 MW; 3988070 CN;
 MQLSGFSTNG SGSLNTIVCE KLLFKPNFVQ DSFIIGMTIL CSVILYGSNG LRYIDALLLA
 SGSCQTQGLQ PVDLTQISIIY QQLTILLFGV LSTPITVNLG LTLFKLYFYN KRYDMVITNN
 KLRMTYTYHT VRRRDTPEPS KVGNRKIRVL LDQGNQMHRP VAPETKAEAA EHQENKHHHR
 HHFRLRKFNAN AIDRPSFFRG NTMPALPSYA GVRNSQENED RTEALSPALG KRRMASIDNG
 SLSVVQNNAR NNPVDFYIPS SFEESFQTI PEDFEPQVHD HENQTQLNHH LDNNSSISSH
 NPSLETANDG NQETVSSSNS NYSTRVDND PHVASVSPQN SNFDHQAAAT TNDHQNVVR
 GSAITIAPTP VPRHNRRIY FADDTNGAEQ EKGARLDGR GRKRGKSAFV TPTLHRNERS
 MSVLPPQLAK SFTSALPRRL TPNRTHTKAS TMSLPYLSYN ATVGRNSAFY ALTPVEREEL
 AGIEYESLRI LTVILVVYFL FWHILGLVAF LIFIYAKTS GRVVTGGIN RGWWAFTSS
 SLFDNLGYSL NSDSLNSFQK AIFPQVLGTI LIFLGNTFFP IMLRFIIWIM IRTTRFSPNF
 QQALYFLFEH PRRSFTLLFP SKTTWVLFNL LTLLNFASFF FFMVLDLGNS YVDKIPVGYR
 IMNAIFQNA TRSAGFTVVD LSQIAPAVMV TYMFM MYISA YPIAMSIRQT NVYEERSLGI
 YAADTENDDD NNINNMNDN NTPKRKNFLM DHIQRQLSHD LWYLFGLGYFI ITIVEGRRLE
 SEAEPQFTLF AILFEVISGY GTVGLSLGYK NDPSLTAQFR KISKLMVAL QIRGRHRLGP
 SALDRAVLMP SSDKNFDRREE DYMRRHGKKN TNRADPVPS

6. Information zur SEQ ID NO.5

a) Sequenzcharakteristika

1. Länge: 4070 Basenpaare
2. Typ: Nukleinsäure
3. Strang: Einzelstrang
4. Topologie: linear

b) Molekültyp: cDNA

c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.5

SQ SEQUENCE 4070 BP; 713 A; 1413 C; 1255 G; 689 T;
 ACGCGGCCTC CTCAGGCCTC CAGCGGCCGG TCGGAGGGGA GGCGGGAGGC GAGCGAGGAC
 CCGCGCCCGC AGTCCAGTCT GTGCGCGCCC GTGCTCGCTT GGCGCGGTGC GGGACCAGCG
 CCGGCCACCC GAAGCCTAGT GCGTCGCCGG GTGGGTGGGC CCGCCCGGCG CCATGGGCTC
 AGGATGCCCG TGCAGAGGGG CCACGTCGCG CCGCAGAACA CCTTCCTGGA CACCATCATC
 CGCAAGTTTG AGGGCCAGAG CCGTAAGTTC ATCATCGCCA ACGCTCGGGT GGAGAACTGC
 GCCGTCATCT ACTGCAACGA CGGCTTCTGC GAGCTGTGCG GCTACTCGCG GGCCGAGGTG
 ATGCAGCGAC CCTGCACCTG CGACTTCCTG CACGGGCCGC GCACGCAGCG CCGCGCTGCC
 GCGCAGATCG CGCAGGCACT GCTGGGCGCC GAGGAGCGCA AAGTGGAAAT GCCTTCTAC
 CGGAAAGATG GGAGCTGCTT CCTATGTCTG GTGGATGTGG TGCCCGTGAA GAACGAGGAT
 GGGGCTGTCA TCATGTTTCT CCTCAATTTT GAGGTGGTGA TGGAGAAGGA CATGGTGGGG
 TCCCCGGCTC ATGACACCAA CCACCGGGGC CCCCCACCA GCTGGCTGGC CCCAGGCCGC
 GCCAAGACCT TCCGCTGAA GCTGCCCGCG CTGCTGGCGC TGACGGCCCG GGAGTCGTCG
 GTGCGGTCGG GCGGCGCGGG CGGCGCGGGC GCGGCGGGG CCGTGGTGGT GGACGTGGAC
 CTGACGCCCG CGGCACCCAG CAGCGAGTCG CTGGCCCTGG ACGAAGTGAC AGCCATGGAC
 AACCACGTGG CAGGGCTCGG GCGGCGGGAG GAGCGGCGTG CGCTGGTGGG TCCCCGCTCT
 CCGCCCCGCA GCGCGCCCGG CCAGCTCCCA TCGCCCCGGG CGCACAGCCT CAACCCCGAC

GCCTCGGGCT CCAGCTGCAG CCTGGCCCGG ACGCGCTCCC GAGAAAGCTG CGCCAGCGTG
 CGCCCGCGCT CGTCGGCCGA CGACATCGAG GCCATGCGCG CCGGGGTGCT GCCCCCGCCA
 CCGCGCCACG CCAGCACCAG GGCCATGCAC CCACTGCGCA GCGGCTTGCT CAACTCCACC
 5 TCGGACTCCG ACCTCGTGCG CTACCGCACC ATTAGCAAGA TTCCCCAAAT CACCCTCAAC
 TTTGTGGACC TCAAGGGCGA CCCCTTCTTG GCTTCGCCCCA CCAGTGACCG TGAGATCATA
 GCACCTAAGA TAAAGGAGCG AACCACAAAT GTCACTGAGA AGGTCACCCA GGTCTGTGCC
 CTGGGCGCCG ACGTGCTGCC TGAGTACAAG CTGCAGGCAC CGCGCATCCA CCGCTGGACC
 10 ATCCTGCATT ACAGCCCTT CAAGGCCGTG TGGGACTGGC TCATCCTGCT GCTGGTTCATC
 TACACGGCTG TCTTCACACC CTACTCGGCT GCCTTCCTGC TGAAGGAGAC GGAAGAAGGC
 CCGCCTGCTA CCGAGTGTGG CTACGCCTGC CAGCCGCTGG CTGTGGTGGG CCTCATCGTG
 GACATCATGT TCATTGTGGA CATCCTCATC AACTTCCGCA CCACCTACGT CAATGCCAAC
 GAGGAGGTGG TCAGCCACCC CGGCCGCATC GCCGTCCACT ACTTCAAGGG CTGGTTCCTC
 15 ATCGACATGG TGGCCGCCAT CCCCTTCGAC CTGCTCATCT TCGGCTCTGG CTCTGAGGAG
 CTGATCGGGC TGCCTGAAGAC TCGCGGCTGG TGCGCGTGCG TCGCGTGCGC GCGGAAGCTG
 GATCGCTACT CAGAGTACGG CGCGGCCGTG CTGTTCTTGC TCATGTGCAC CTTTGCGCTC
 ATCGCGCACT GGCTAGCCTG CATCTGGTAC GCCATCGGCA ACATGGAGCA GCCACACATG
 20 GACTCACGCA TCGGCTGGCT GCACAACCTG GCGGACCAGA TAGGCAAACC CTACAACAGC
 AGCGGCCTGG GCGGCCCCCTC CATCAAGGAC AAGTATGTGA CCGCGCTCTA CTTACCTTC
 AGCAGCCTCA CCAGTGTGGG CTTGCGCAAC GTCTCTCCCA ACACCAACTC AGAGAAGATC
 TTCTCCATCT GCGTCATGCT CATTGGCTCC CTCATGTATG CTAGCATCTT CGGCAACGTG
 TCGGCCATCA TCCAGCGGCT GTACTCGGGC ACAGCCCGCT ACCACACACA GATGCTGCGG
 25 GTGCGGGAGT TCATCCGCTT CCACCAGATC CCAATCCCC TCGCCAGCG CCTCGAGGAG
 TACTTCCAGC ACGCTGGTC CTACACCAAC GGCATCGACA TGAACGCGGT GCTGAAGGGC
 TTCCCTGAGT GCCTGCAGGC TGACATCTGC CTGCACCTGA ACCGCTCACT GCTGCAGCAC
 TGCAAACCT TCCGAGGGGC CACCAAGGGC TGCTTCGGG CCCTGGCCAT GAAGTTCAAG
 30 ACCACACATG CACCGCCAGG GGACACACTG GTGCATGCTG GGGACCTGCT CACCGCCCTG
 TACTTCATCT CCCGGGGCTC CATCGAGATC CTGCGGGGCG ACGTCGTCGT GGCCATCCTG
 GGAAGAATG ACATCTTTGG GGAGCCTCTG AACCTGTATG CAAGGCCTGG CAAGTCGAAC
 GGGGATGTGC GGGCCCTCAC CTACTGTGAC CTACACAAGA TCCATCGGGA CGACCTGCTG
 GAGGTGCTGG ACATGTACCC TGAGTTCTCC GACCACTTCT GGTCCAGCCT GGAGATCACC
 35 TTCAACCTGC GAGATACCAA CATGATCCCC GGCTCCCCCG GCAGTACGGA GTTAGAGGGT
 GGCTTCAGTC GGCAACGCAA GCGCAAGTTG TCCTTCGCA GGCGCACGGA CAAGGACACG
 GAGCAGCCAG GGGAGGTGTC GGCCTTGGGG CCGGGCCGGG CCGGGGCGAG GCCGAGTAGC
 CCGGGCCGGC CCGGGGGGCC GTGGGGGGAG AGCCCGTCCA GTGGCCCTC CAGCCCTGAG
 40 AGCAGTGAGG ATGAGGGCCC AGGCCGCAGC TCCAGCCCC TCCGCCTGGT GCCCTTCTCC
 AGCCCCAGGC CCCCCGAGA GCCGCCGGGT GGGGAGCCCC TGATGGAGGA CTGCGAGAAG
 AGCAGCGACA CTTGCAACCC CCGTGCAGGC GCCTTCTCAG GAGTGTCAA CATTTTCAGC
 TTCTGGGGGG ACAGTCGGGG CCGCCAGTAC CAGGAGCTCC CTCGATGCCC CGCCCCACC
 45 CCCAGCCTCC TCAACATCCC CCTCTCCAGC CCGGTCGGC GGCCCCGGGG CGACGTGGAG
 AGCAGGCTGG ATGCCCTCCA GCGCCAGCTC AACAGGCTGG AGACCCGGCT GAGTGCAGAC
 ATGGCCACTG TCCTGCAGCT GCTACAGAGG CAGATGACGC TGGTCCCGCC CGCCTACAGT
 GCTGTGACCA CCCCCGGGCC TGGCCCCACT TCCACATCCC CGCTGTTGCC CGTCAGCCCC
 CTCCCCACCC TCACCTTGGA CTCGCTTCT CAGGTTTCCC AGTTCATGGC GTGTGAGGAG
 50 CTGCCCCCGG GGGCCCCAGA GCTTCCCCAA GAAGGCCCCA CACGACGCCT CTCCCTACCG
 GGCCAGCTGG GGGCCCTCAC CTCCCAGCCC CTGCACAGAC ACGGCTCGGA CCCGGGCGAGT
 TAGTGGGGCT GCCCAGTGTG GACACGTGGC TCACCCAGGG ATCAAGGCGC TGCTGGGCGG
 CTCCCCCTGG AGGCCCTGCT CAGGAGGCCC TGACCGTGGG AGGGGAGAGG AACTCGAAAG
 55 CACAGCTCCT CCCCCAGCCC TTGGGACCAT CTTCTCCTGC AGTCCCCTGG GCCCAGTGA
 GAGGGGCGAG GGCAGGGCCG GCAGTAGGTG GGGCCTGTGG TCCCCCACT GCCCTGAGGG
 CATTAGCTGG TCTAACTGCC CGGAGGCACC CGGCCCTGGG CCTTAGGCAC CTCAAGGACT
 TTTCTGCTAT TTAAGTCTCT TATTGTTAAG GATAATAATT AAGGATCATA TGAATAATTA
 60 ATGAAGATGC TGATGACTAT GAATAATAAA TAATTATCCT GAGGAGAAAA

60

65

7. Information zur SEQ ID NO.6

a) Sequenzcharakteristika

1. Länge: 1159 Aminosäurereste
2. Typ: Aminosäure
3. Strang: kodierend
4. Topologie: linear

b) Molekültyp: Protein

c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.6

FT CDS 184..3663
 FT /STANDARD_NAME="HUMAN EAG RELATED GENE"
 FT /GENE="HERG"
 FT /NOTE="NCBI GI: 487738"
 FT /PRODUCT="PUTATIVE POTASSIUM CHANNEL SUBUNIT"
 FT /CODON_START=1
 FT
 /TRANSLATION="MPVRRGHVAPQNTFLDTIIRKFEGQSRKFIIANARVENCAVIYC
 FT NDGFCELCGYSRAEVMQRPCTCDFLHGPRTORRAAAQIAQALLGAEERKVEIAFYRKD
 FT GSCFLCLVDVVPVKNEGDGAVIMFILNFEVVMKDMVGS PAHDTNHRGPPTS SWLAPGRA
 FT KTFRLKLPALLALTARESSVRS GGAGGAGAPGAVVVDVLT PAAPSSSESLALDEV TAM
 FT DNHVAGLCPAEERRALVGP GSPPRSAPGQLPS PRAHSLNPDASGSSCSLARTRS RESC
 FT ASVRRASSADDIEAMRAGVLP PPPRHASTGAMHPLRSGLLNSTSDSDLVRYRTISKIP
 FT QITLNFVDLKGDPFLASPTS DREIIAPKIKERTHNVTEKVTQVLSLGADVLPEYKLQA
 FT PRIHRWTILHYSPPFKAVWDWLILLLVITYTAVFTPYSA AFLKETE GPPATECGYACQ
 FT PLAVVDLIVDIMFIVDILINFRTTYVNANEEV VSHPGRIAVHYFKGWFLIDMVAAIPF
 FT DLLIFGSGSEELIGLLKTARLLRLVRVARKLD RYSEYGA AVLFLLMCTFALIAHWLAC
 FT IWYAIGNMEQPHMDSRIGWLHNLGDQIGKPYNSS GLGGPSIKDKYVTALYFTFSS LTS
 FT VGFGNVSPNTNSEKIFSICVMLIGSLMYASIFGNVSAIIQRLYSGTARYHTQMLRVRE
 FT FIRFHQIPNPLRQRLEEYFQHAWSY TNGIDMNAVLKGFPECLQADICLHLNRSLLQHC
 FT KPFRGATKGCLRALAMKFKTHAPPGDTLVHAGDLLTALYFISRGSIEILRGD VVVAI
 FT LGKNDIFGEPLNLNYPGKSNGDVRLTYCDLHKIHRDDLLEVLDMP EFSDFHFWSSL
 FT EITFNLRLDTNMIPGSPGSTELEGGFSRQRKRKLSFRRTD KDTEQPGEVSALGPGRAG
 FT AGPSSRGRPGGPWGESPSSGSPSEDEGPGRSSSPLRLVPFSSPRPPGEP PGGE
 FT LMEDCEKSSDTCNPLSGAFSGVSNIFSFWGDSRGRQYQELPRCPAPT PSLNIPLSSP
 FT GRRPRGDVESRLDALQRQLNRLETRL SADMATVLQLLQRQMTLVPPAYS AVTTPGPGP
 FT TSTSPLLVPVSPPLTLTLDLSLQVSQFMACEELPPGAPELPQEGPTRRLSLPGQLGALT
 FT SQPLHRHGS DPGS"

8. Information zur SEQ ID NO.7

a) Sequenzcharakteristika

5. Länge: 54 Basen
6. Typ: Nukleinsäure
7. Strang: Einzelstrang
8. Topologie: linear

b) Molekültyp: Oligonukleotid

c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.7

5' CAC GGA TCC ACA GAT TTT ATC ATG CAG TTA TCG GGT TTT TCT ACA AAC GGT TCC 3'

9. Information zur SEQ ID NO.8

a) Sequenzcharakteristika

9. Länge: 20 Basen
10. Typ: Nukleinsäure
11. Strang: Einzelstrang
12. Topologie: linear

b) Molekültyp: Oligonukleotid

c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.8

5' CGC GAA AGA AGC TTG GGC GA 3'

Patentansprüche

1. Schizosaccharomyces pombe Mutanten mit Defekten in der Kaliumaufnahme die erhältlich sind durch Mutation der Kaliumtransporter TKHp und/oder Trk2p, Einführung einer oder mehrerer selektiver Marker (Auxotrophien und/oder Resistenzen).
2. Schizosaccharomyces pombe Mutanten tkh, trk2 und tkh trk2
3. Verwendung der Schizosaccharomyces pombe Mutanten nach Anspruch 1 oder 2 als Wirtsorganismus zur homologen oder heterologen Expression von Kaliumionen Kanälen.
4. Ein genetisch modifizierter Schizosaccharomyces pombe Hefestamm der die Nukleinsäuresequenz für das humane erg Kaliumionen-Kanal Gen (HERG) aber nicht die der Hefe eigenen Kaliumtransporter TKHp und Trk2p exprimiert.
5. Ein Verfahren zur Detektion spezifischer Modulatoren des HERG Kaliumionen-Kanals, einschließlich:
- a) Die Behandlung des Schizosaccharomyces pombe Hefewirtsstamms, der die Nukleinsäuresequenz für den humanen erg Kaliumionen-Kanal (HERG) oder ein funktionelles Derivat oder eine Mutationsform dieses Kaliumionen-Kanals aber nicht die der Hefe eigenen TKHp oder Trk2 Kaliumionen-Transportproteine exprimiert mit Testsubstanzen.
 - b) Wachstumsbestimmungen in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz.
 - c) Messungen des Anstiegs oder der Abnahme des Kaliumtransportes derjenigen Stämme in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz.
6. Ein Verfahren nach Anspruch 4 zur Detektion von anti-arrythmische Substanzen.
7. Ein Verfahren nach Anspruch 4 zur Detektion von antifibrillatorische Substanzen.
8. Ein Verfahren nach Anspruch 4 zur Detektion von anti-entzündlichen Substanzen.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

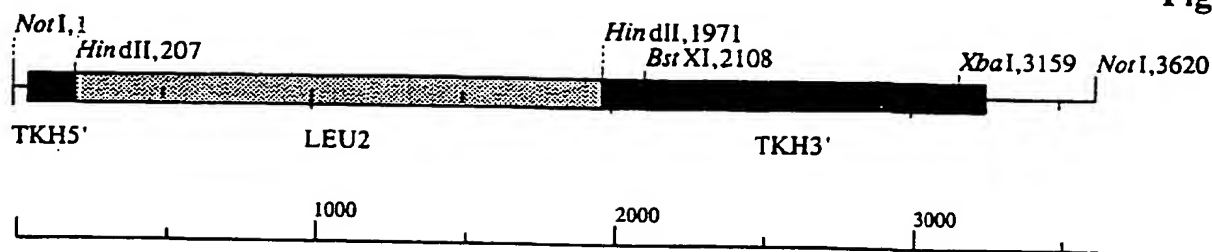
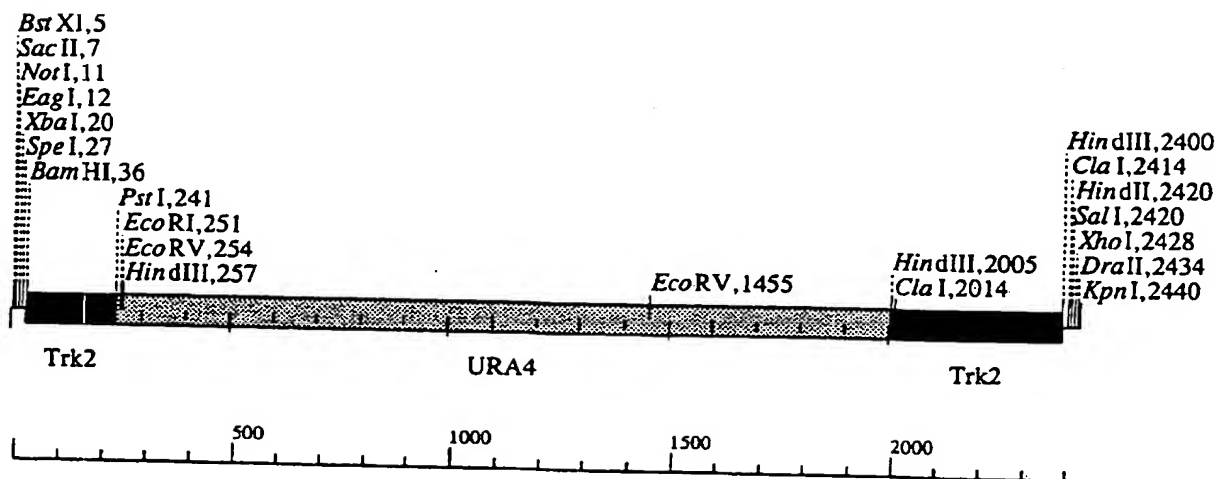
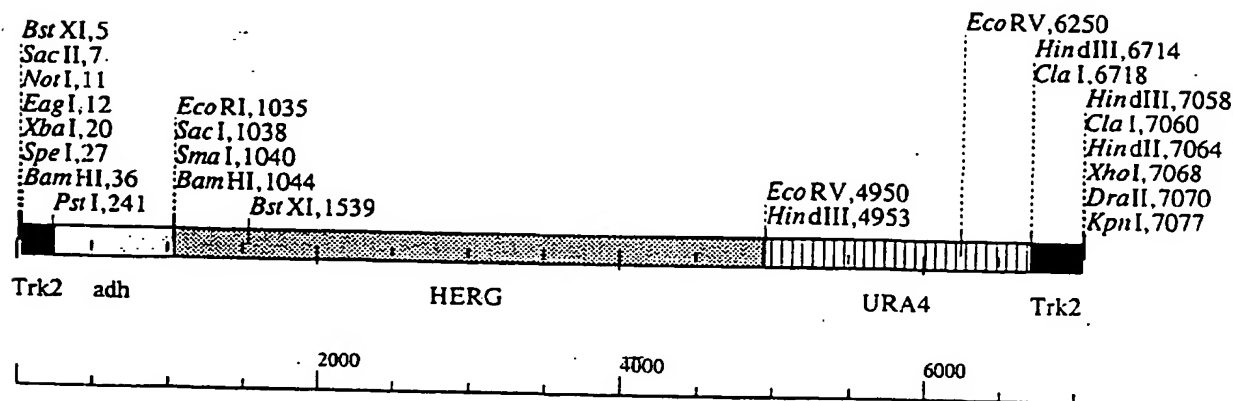
**Tkh::LEU2 (3620 bps)****Trk2::URA4 (2440 bps)****Trk2::adhHerg/Ura4 (7077 bps)**

Fig.2A

ID SPTRKH PRELIMINARY; DNA; 2958 BP.

AC L36563;

DT 01-OCT-1994 (REL. 41, CREATED)

DT 01-OCT-1995 (REL. 45, LAST UPDATED, VERSION 2)

DE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE K+ TRANSPORTER TRK HOMOLOGUE GENE,

DE COMPLETE CDS.

KW K+ TRANSPORT PROTEIN.

OS SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE (YEAST)

OC EUKARYOTA; PLANTAE; THALLOBIONTA; EUMYCOTA; HEMIASCOMYCETES;

OC ENDOMYCETALES; SACCHAROMYCETACEAE.

RN [1]

RP 1-2958

RA SOLDATENKOV V.A., VELASCO J.A., AVILA M.A., DRITSCHILLO A.,

RA NOTARIO V.;

RT "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SP TRK, A GENE FROM

RT SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE PREDICTED TO ENCODE A K+ TRANSPORTER

RT PROTEIN";

RL GENE 161:97-191(1995).

DR SWISS-PROT; P47946; TRK_SCHPO.

CC NCBI GI: 550525

FT SOURCE 1..2958

FT /ORGANISM="SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE"

FT /SEQUENCED_MOL="DNA"

FT CDS 302..2803

FT /NOTE="NCBI GI: 550526"

FT /CODON_START=1

FT /PRODUCT="K+ TRANSPORTER HOMOLOGUE"

FT /DB_XREF="PID:G550526"

FT /DB_XREF="SWISS-PROT:P47946"

FT /TRANSLATION="MVQVGDNTNFWIQGNSLYLHISLTIIASVLLFTGGTTTKIK

FT FLASSATTOTGLNSVDLNSLSIWQQFIFYGFTAITVPIWMHGSISFIRLYWFR

FT VRQNRTRKFQRLKRLKSLMKKSEDEEQGVRGRKIRVMLPYLHSLRSPTSLKNFS

FT DSTNNPYFPDNPSPKADISKDEYFGKYLPKKSDTLDMDLESHNMTFHDYEPSI

FT DFGSSHSASMQYEMDDLHPRLRRQSSFISSVNPLEADYTRETLSEGLVQESL

FT YSDTNLVSRDSFTLTGDDNLFPEGGLRPANTIDGIVRSLSLSSSLSKDTEPST

FT AFTGLNKPTIERERNLKLKRSRKYKSLRSRFSRGLHRPIRWTKSFTSNRRNL

FT LSSAFKKHEPSISSRHTTMSLPYLSYNPTVDRNSAFVALSKEQRDELGGIEYR

FT CSMVILYFIIIFNIAAFVTIFVAYTAVGSREVIDSYDLRRGWALFSSASSFND

FT IPSSEFVPMNRNIFLLLISSLFIIAGNTGFPCFFRTFIWTTYKLYPFSEKKEAM

FT HPRRCFTLLFPAGATWVLFVLLLLNVIDLVLFMVLDTGSKAVASLPKGIKRVN

FT VCTRAGFTSVSISELHPVLVSYVMYIISVYPVAINMRNTNVYEERSLGVIYR

FT GKSFLDKHLTEQLSYDLWYIFLGLFIIICIEGGKISNPLDTSIFTVLFEVVS

FT GLSTGLSSSNCSLSARFTTISKLVIIALELRGRHRLPRAVVRALLPSEKNNL

FT YQRRHGFSIDNARGSIASVSRD"

SQ SEQUENCE 2958 BP; 824 A; 577 C; 551 G; 1006 T; 0 OTHER;

AAAGAAGACG CGATTTTACG TTGTATTATA AGAGAGGAAT CCTCAAGTAT TGTTGAAAGG

AATCGTCAAA GATTEGGTAA AAATGTCGTT TGTCATTGT CATAATTCCC TTTAGAAAT

TTAGTGGTTT CCTCATCAGT ATCGCTTTTA CCCGTAGATT TCAAAACTAA TTGCTTCTTA

TCTTGTCAT AGTTAAGGAT TTCCGTTAAC TTCAAACCAA TTTCTCTGTT TCTTGTTCTG

TTGTTGGTGG GTTGGCTGG AACTATTGAC TAAATAAAT GGTCTTAAAT TACATTCAA

GATGGTTCAA GTGGGTGATA CCAACTTTTG GATTCAAGGC AATTCATTAT ATTTACATAT

ATCCTTAACT ATCATTGCCT CTGTCCTACT TTTTACCGGA GGGACCACCA CGAAAATCAA

GTATATCGAT GCTTTATTCT TAGCTAGCAG CGCAACTACC CAAACAGGCC TTAACAGTGT

TGACTTAAAT TCTTTATCTA TCTGGCAGCA GTTTATCCTG TATGGATTAT CTGCTATTAC

GGTTCCTATA TGGATGCACG GAAGTATTTT CTTTCATCCG CTGTATTGGT TTCGACGAAA

ATTTAAGAC GTTGTTCTGTC AAAATCGTAC TCGAAAATTT CAGAGAAAGC TCCGTAAAAAG

CTTAATGAAA AAAAGCGAGG ATGACGAAGA ACAGGGTGTG CGTGGTAGAA AAATTCGTGT

AATGTTACCA TACCTACATT CACTAAGGAG TCCAACGTCT CTAAAAAACT TCTCGAGATT

TGACACGCAT GACAGTACGA ACAATCCGTA CTTTCCTGAC AACCCCCCTT CTCCCAAGGC

AGATATATCT AAAGACGAGT ATTTTGAAA GTATCTCCCA AAAAGTCTG ATACGCTAGA

CATGGATTG GAAAGTCACA ACATGACTTT TCATGACTAT GAACCTTCCA TTGAAAATAA

AAATTACGAT TTTGGTAGTT CGCATTCAGC CTCGATGCAA ATGTATGAAA TGGATGACCT

TCATCCCCGA CTCGTAGAC AAAGCTCTTT TATTCCTCC GTTAATCCTT TAGAGGCTGA

CTACACCCGT GAAACTTTAT CTGAAGGCGC CTTAGTTCAG GAATCTCTCC CTATGGCTTA
TAGTTATTCT GATACTAATT TGGTTGTATC GAGGGATTCA TTTACTCTCA CTGGGGACGA
CAATCTTTTC CCAGAAGGTG GTTTAAGGCC TGCCAATACA ATAGACGGAA TAGTAAGGTC
GTCTCTGTCT TCTTCCTCCC TATCTAAAGA CACTGAACCA TCGACAGTTG ACATGCATAT
TGCTTTCACC GGACTTAATA AGCCCACCAT AGAGCGTGAA CGTAATCTTA AACTAAGAAA
AAAAAGTCGT TTTTATAAAA AATCTTTACG TTCCAGATTT TCGCGAGGAC TTCATCGTCC
AATACGTTGG ACAAAGTCAT TCACTTCTAA CCGACGAAAC TTGACTCTTG AACGAGTCCT
TTCTTCTGCC TTTGCTAAAA AACATGAGCC TTCTATTTC AACAAGACACA CTACTATGTC
ACTTCCCTAT TTGTCGTATA ATCCTACTGT CGATCGTAAT TCTGCTTTCG TTGCTTTGTC
TAAAGAACAG CGGGACGAGC TGGGTGGAAT TGAATATAGA GCTTTGAAAT GCGTCTGCTC
CATGGTTATC CTTTATTTTA TCATTTTAA TATTGCTGCC TTTGTGACCT TCATTGTTTT
TGCTTATACG GCAGTGGGAT CGCGAGAGGT AATAGATTCT TATGACTTAC GTCGTGGGTG
GTGGGCGTTA TTCTCGTCTG CTTCTTCATT TAATGATTTG GGGTTTTCTT TAATACCATC
GTCTTTTGTC CCAATGAATC GAAACATTTT TCTTTTGTTG ATTTTCATCTT TATTCAATAT
CGCAGGTAAC ACGGGATTCC CTTGTTTTTT TAGAACATTC ATTTGGACAA CGTATAAGCT
ATACCCTTTT AGTTTTGAGA AGAAAGAAGC TATGGCATT CTCTTGATC ATCCTCGACG
ATGTTTCACT TTATTGTTTC CATCTGGAGC AACCTGGGTC TTGTTTTTTG TTTTGCTGCT
GCTTAATGTC ATTGATCTGG TATTGTTTCAT GGTCTTAGAT ACTGGAAGTA AAGCAGTCGC
TAGCCTTCCT AAAGGTATTA GGGTTGTAAA TGCAATATTT CAATCAGTTT GTACAAGAAC
CGCAGGATTC ACGAGTGTAT CAATTAGTGA ACTTCACCCA GCAGTACTGG TCAGTTACAT
GGTTATGATG TATATTTCTG TTTATCCAGT TGCTATCAAC ATGAGAAATA CCAATGTTTA
TGAGGAGCGA TCTTTGGGTG TTTACAGAAC TGAAGATGAT GAGGGGAAAT CTTTCTTAAA
AGATCACCTT ACTGAACAAT TAAGTTACGA TTTATGGTAT ATTTTCTAG GGCTATTCAT
CATATGCATT TGTGAAGGAG GTAAAATCTC CAATCCTCTA GATACCGATT TCAGTATTTT
TACTGTCCTT TTTGAAGTAG TCTCTGCTTA CGGTACGGTG GGACTTAGTA CTGGATTAAG
CTCCTCAAAT TGTTCACTTT CAGCAAGATT TACTACTATA AGTAACTAG TTATTATAGC
ACTTGAAC TGCGGTAGAC ATAGAGGTTT ACCCAGGGCT GTTGTACGAG CCATCCTTCT
TCCTTCTGAA AAAATAATC TGAAAGAAGA AGAAGATTAT CAACGTCGTC ACGGATTTTC
CATAGACAAC GCACGTGGCA GTATTGCAGT TTCTCGAGAC TGATATTTCT TATCACGATC
ATGTATTATA TTTGTAAATT ATATCATCTA ATAAATAGTA CTCCGCTAAA TTTCACTACTC
CTGATCGATA CACCGTTTGT CCGCCATTTT TGAGTTGAAT TGTTTCCTTC GACGAAAGAA
TTTGTAAGC CATTTCTA

Fig.2B

ID SPTRK2 PRELIMINARY; PRT; 880 AA.
 DT 01-NOV-1997 (CREATED BY PC/GENE PROGRAM TRANSL)
 DE 3CH POMBE
 OS SPTRK2 OHNE INTRONS
 CC TRANSLATED FROM DNA SEQUENCE SPTRK2 (BASES 15 TO 2654).
 SQ SEQUENCE 880 AA; 99848 MW; 3988070 CN;

Fig.3A

MQLSGFSTNG SGLNTIVCE KLLFKPNFVQ DSFIIGMTIL CSVILYSGSN LRYIDALLLA
 SCSCTQTGLQ PVDLTQISY QQLTILLFGV LSTPITVNLG LTLEKLYFYN KRYDMVITNN
 KLRMTYTYHT VRRRDTPEPS KVGNRKIRVL LDQGNQMHRP VAPETKAEAA EHQENKHHR
 HHFRLRKFN AIDRPSFFRG NTMPALPSYA GVRNSQENED RTEALSPALG KRRMASIDNG
 SLSVVQNNAR NNPVDFYIPS SFEESFQTI PEDFEPQVHD HENQTQLNHH LDNNSSISSH
 NPSLETANDG NQETVSSNS NYSTTRVDND PHVASYSQPN SNFDHQAAAT TNDHQNVVR
 GSAITIAPT VPRHNRPIY FADDTNGAEQ EKGARLDGR GRKRGKSAFV TPTLHRNERS
 MSVLPFQLAK FTSALPRRL TFNRHTKAS TMSLPYLSYN ATVGRNSAFY ALTPVEREEL
 AGIEYESLRI LTVILVYFL FWHILGLVAF LIFIYTAITS GRVVTDDGIN RGWWAFTSS
 SLFDNLGYSL NSDSLNSFQK AIFPQVLGTI LIFLGNTFFP IMLRFIIWIM IRTTRFSPNF
 QQALYFLFEH PRRSFTLLFP SKTTWVLFNL LTLNLFASFF FFMVLDLGN YVDKIPVGYR
 IMNAIFQNA TRSAGFTVVD LSQIAPAVMV TYMFMYISA YPIAMSIRQT NVYEERSLGI
 YAADTENDDD NNINNNNDN NTPKRKNFLM DHIQRLSHD LWYLFGLGYFI ITIVEGRRLE
 SEAEPQFTLF AILFEVISGY GTVGLSLGYK NDPSLTAQFR KISKLVMLVAL QIRGRHRGLF
 SALDRAVLMP SSKNFDRREE DYMRRHGKKN TNRADPVPSS

//

ID SPTRK2 PRELIMINARY; DNA; 2906 BP.
 SQ SEQUENCE 2906 BP; 828 A; 550 C; 540 G; 888 T; 0 OTHER;
 ATACAGATTT TATCATGCAG TTATCGGGTT TTTCTACAAA CGGTTCCGGT TCCTTGAATA
 CCATTGTATG TGAAAACTT CTTTTCAAGC CTAACCTTGT TCAAGATTCT TTTATAATAG
 GAATGACTAT TTTATGTTCA GTAATATTGT ATGGGTCGGG AAATTTGCGC TACATAGATG
 CTTTGTGTGT GGCTTCTGGT TCTTGTAATC AGACTGGCTT GCAGCCTGTG GACCTCACGC
 AGATATCCAT TTACCAACAG TTAACATATC TCCTTTTGG AGTTTGTAGT ACACCAATTA
 CTGTGAACCT GGGCTTGACT TTGTTTAAGC TGTACTTCTA TAACAAGCGA TATGACATGG
 TCATAACAAA TAATAAACTT AGGATGACAT ATAATTATCA CACTGTAAGA AGAAGGGATA
 CTCCAGAGCC TTCCAAAGTT GGCAATCGAA AAATTCGGGT TTTGTTAGAC CAGGGTAATC
 AAATGCACCG GCCAGTTGCC CCAGAGACTA AGGCTGAGGA AGCTGAACAC CAAGAGAATG
 AAAAACATCA CAGGCACCAT TTTCTGCTAA GGAAATTTGC TAATGCAATC GATCGCCCAA
 GCTTCTTTTCG CGGGAATACC ATGCCCGCTC TCCCTAGTTA TGCAGGTGTT AGAAATCTCT
 AAGAAAATGA AGACAGAACT GAAGCATTA TCCAGCTCT TGGGAAACGA AGAATGGCAT
 CAATCGACAA TGGATCTTTA TCCGTTGTAC AAAACAATGC TAGAAATAAT CCTGTGCACT
 TTTACATTCC TAGTTCGTTT GAAGAATCAT CTTTCAAAC AATTCTCTGAG GATTTTGAGC
 CTCAAGTACA TGACCACGAG AATCAAACAC AACTGAACCA TCATCTGGAT AACAACAGTT
 CTATCTCTTC GCACAATCCT TCCCTAGAAA CTGCAAATGA TGGTAATCAG GAAACTGTTT
 CATCCTCAAA CTCAAACAT AGCACAACAA GAGTTGACAA TGATCCACAT GTAGCATCTT
 ATTCACCTCA AAATTCGAAT TTTGATCATC AGGCTGCTGC AACTACTAAC GATGCACATC
 AAAATGTAGT ACGCGGCTCT GCAATTACCA TTGCACCAAC CCCTGTTCCC AGGCATAATC
 GCAGGCCTAT ATATTTTGCT GATGACACGA ATGGAGCTGA GCAGGAAAAA GGTGCTCATC
 GACTTGATGG ACGAGGTAGA AAACGTGGTA AATCATTTGC TGTTACACCT AACTTTCACA
 GGAATGAGCG CTCAATGTCT GTCCTACCAT TTCAATTAGC CAAATCATT ACATCTGCTC
 TTCCTCGAAG ACTCACATC AACCGTACTC ACACGAAAGC TAGCACAATG AGTTTACCTT
 ATTTATCGTA CAATGCAACA GTGGGCAGAA ATTCTGCATT TTATGCCTTA ACTCCAGTGG
 AGAGAGAAGA ATTGGCGGGA ATTGAATATG AATCTCTCAG GATATTGACT GTCATATTAG
 TGGTTTATTT TCTGTTTGG CATATTCTTG GTTTGGTTGC GTTCCTAATA TTCATTTATA
 CTGCTAAAAC ATCCGGTCGT GTAGTTACGG ACGGCGGTAT AAATAGAGGC TGGTGGGCAG
 CGTTTACTTC TAGTTCGCTG TTTGATAATC TAGGCTATTC GTTGAACAGC GATTCCTTAA
 ATTCCTTTCA AAAAGCCATA TTTCTCAGG TTCTTGGAAC TATTCTGATA TTTTATAGGA
 ATACTTTCTT TCCAATTATG CTCCGGTTTA TAATTTGGAT TATGATACGA ACAACGAGAT
 TTTGCGCTAA TTTCCAGCAA GCTTTGTACT TTCTTTTCGA ACACCTCGA CGAAGTTTAA
 CTCTTCTGTI TCCTTCAAAA ACTACTTGGG TGCTTTTCTT AAATTTAACT TTATGAAT
 TTGCTTCCTT TTTCTTTTTT ATGGTTTTAG ACTTGGGTAA TTCATATGTT GACAAAATTC
 CAGTTGGTTA TCGAATTATG AATGCTATAT TTCAAACGC AGCTACACGT TCTGCTGGCT
 TTACGGTGGT TGATTTAAGC CAAATTGCTC CGGCAGTAAT GGTGACCTAC ATGTTTATGA
 TGTATATCTC TGCCTATCCA ATCGCAATGA GTATTGACA AACTAATGTT TACGAGGAAC
 GTTCTCTTGG AATATATGCA GCAGACACCG AAAATGATGA TGATAATAAT ATTAATAATA
 ATAATAATGA TAATAATACG CCGAAAAGGA AAAATTTTTT GATGGACCAT ATACAAAGGC
 AACTGAGTCA CGATTTGTGG TATTTATTCC TAGGCTACTT CATAATTACT ATAGTCGAAG

GTCGTCGATT AGAGTCGGAA GCGGAACCGC AATTTACGCT TTTTGCTATT TTATTCGAGG
TGATTTTCAGG CTATGGCACT GTGGGCCTAA GCTTAGGGTA CAAAAATGAT CCTTCGCTTA
CGGCTCAGTT TCGGAAAATT AGCAAACCTG TTATGGTTGC ACTACAGATT CGTGGACGAC
ATAGAGGACT TCCAAGTGCA TTAGATAGAG CAGTGCTAAT GCCTTCGGAT AAAAAGCTTG
ACCGGGAAGA AGAGGATTAT ATGAGACGTC ACGGGAAAAA AAATACTAAT AGAGCAGACC
CGGTACCCAG TTCTTAATGA TTATAACCTC ACGGTTGATT AGACTTACTT TCTATGAAAA
TGCAAGGCAA GGTCAAGGAGC TAATGAAACT TGTACTGTAT CTTCTGGTTC TGTGCCATTT
TAACTGATTG GGCCTTAAAA GAACTTTTTG TTTTATTTTA TTTTAC

Fig.3B

//

Fig.4A

ID HERG PRELIMINARY; DNA; 4070 BP.
 DE HUMAN PUTATIVE POTASSIUM CHANNEL SUBUNIT (HERG) MRNA, COMPLETE CDS.
 AC U04270;
 OS HOMO SAPIENS
 OC EUCARYOTAE; METAZOA; CHORDATA; VERTEBRATA; GNATHOSTOMATA; MAMMALIA;
 OC EUTHERIA; PRIMATES; CATARRHINI; HOMINIDAE; HOMO.
 RN [1] (BASES 184-3663)
 RA WARMKE J.W., GANETZKY B.
 RT "A NOVEL FAMILY OF POTASSIUM CHANNEL GENES RELATED TO EAG IN
 RT "DROSOPHILA AND MAMMALS
 RL PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. (1994) IN PRESS
 RN [2] (BASES 1-4070)
 RA WARMKE J.W.
 RT "DIRECT SUBMISSION
 RL SUBMITTED (09-DEC-1993) JEFFREY W. WARMKE, GENETICS AND MOLECULAR
 RL BIOLOGY, MERCK RESEARCH LABORATORIES, 126 EAST LINCOLN AVENUE, P.O.
 RL BOX 2000, RAHWAY, NJ 07065, USA
 FH KEY LOCATION/QUALIFIERS
 FT SOURCE 1..4070
 FT /CLONE="PBII+HH1, PBII+HH10, PBHH10-4.5"
 FT /CLONE_LIB="STRATAGENE NUMBER 936205 HUMAN HIPPOCAMPUS
 FT CDNA LIBRARY"
 FT /CHROMOSOME="7"
 FT /ORGANISM="HOMO SAPIENS"
 FT /TISSUE_TYPE="HIPPOCAMPUS"
 FT /DEV_STAGE="2 YEAR OLD"
 FT /SEX="FEMALE"
 FT CDS 184..3663
 FT /STANDARD_NAME="HUMAN EAG RELATED GENE"
 FT /GENE="HERG"
 FT /NOTE="NCBI GI: 487738"
 FT /PRODUCT="PUTATIVE POTASSIUM CHANNEL SUBUNIT"
 FT /CODON_START=1
 FT /TRANSLATION="MPVRRGHVAPQNTFLDTIIRKFEGQSRKFIIANARVENCAVIYC
 FT NDGFCELCGYSRAEVMQRPCTCDLHGPRTQRRAAQIAQALLGAEERKVEIAFYRKD
 FT GSCFLCLVDVVPVKNEGDGAVIMFILNFEVVMKEDMVGSPAHDNTNHRGPPTSWLAPGRA
 FT KTFRLKLPALLALTARESSVRS GGAGGAGAPGAVVVDVLTAPA PSSESLALDEV TAM
 FT DNHVAGLGPAEERRALVGPSPPRSAPGQLPSRAHSLNPDASGSSCSLARTRSRESC
 FT ASVRRASSADDIEAMRAGVLP PPPRHASTGAMHPLRSGLLNSTSDSDLVRYRTISKIP
 FT QITLNFVDLKGDPFLASPTSDREIIAPKIKERTHNVTQVLSLGADVLPEYKLOA
 FT PRIIRWTILHYSPFKAVWDWLILLVIYTA VFTPYSAFLLKETEEGPPATECGYACQ
 FT PLAVVDLIVDIMFIVDILINFRTTYVNANEEVVSHPGRIAVHYFKGWFLIDMVAAIPF
 FT DLLIFGSGSEELIGLLKTARLLRLVRVARKLD RYSEYGA AVLFLLMCTFALIAHWLAC
 FT IWYAIGNMEQPHMDSRIGWLHNLGDQIGKPNSSGLGGPSIKDKYVTALYFTFSSLTS
 FT VGFGNVSPNTNSEKIFSICVMLIGSLMYASIFGNVSAIIQRLYSGTARYHTQMLRVRE
 FT FIRFHQIPNPLRQRLEEYFQHAWSYTN GIDMNAV LKGFPECLQADICLHLNRSLLQHC
 FT KPFRGATKGCLRALAMKFKTTHAPPGDTLVHAGDLLTALYFISRGSIEILRGDVVVAI
 FT LGKNDIFGEPLNLYARPGKSNGDVRLTYCDLHKIHRDDLLEVLDMYPEFSDFWSSL
 FT BITFNL RDTNMIPGSPGSTELEGGFSRQRKRKLSFRRRTDKDTEQPGEVSALGPGRAG
 FT AGPSSRGRPGGPWGESPSSGPSSPESEDEGPGRSSSPLRLVPFSSPRPPGEPGGEPP
 FT LMEDCEKSSDTCNPLSGAFSGVSNIFSWGDSRGRQYQELPRCPAPTSLNIP LSSP
 FT GRRPRGDVESRLDALQRQLNRLETRL SADMATVLQLLQRQMTLVPPAYSAVTTPGPGP
 FT TSTSPLLPVSPPLTLTLDLSLSQVSQFMACEELPPGAPELPQEGPTRRLSLPGQLGALT
 FT SOPLHRHGS DPGS"
 CC ORIGIN
 SQ SEQUENCE 4070 BP; 713 A; 1413 C; 1255 G; 689 T;
 ACGCGGCCTG CTCAGGCCTC CAGCGGCCCG TCGGAGGGGA GCGGGGAGGC GAGCGAGGAC
 CC3CGCCCGC AGTCCAGTCT GTGCGCGCCC GTGCTCGCTT GCGCGCGTGC GGGACCAGCG
 CC3GCCACCC GAAGCCTAGT GCGTCGCGCG GTGGGTGGGC CCGCCCGGCG CCATGGGCTC
 AG3ATGCCGG TGCGGAGGGG CCACGTCGCG CCGCAGAACA CCTTCCTGGA CACCATCATC
 CGCAAGTTTG AGGGCCAGAG CCGTAAGTTC ATCATCGCCA ACGCTCGGT GGAGAACTGC
 GCCGTCATCT ACTGCAACGA CGGCTTCTGC GAGCTGTGCG GCTACTCGCG GGCCGAGGTG

ATGCAGCGAC CCTGCACCTG CGACTTCCTG CACGGGCCGC GCACGCAGCG CCGCGCTGCC
 GCGCAGATCG CGCAGGCACT GCTGGGCGCC GAGGAGCGCA AAGTGGAAAT CGCCTTCTAC
 CGGAAAGATG GGAGCTGCTT CCTATGTCTG GTGGATGTGG TGCCCGTGAA GAACGAGGAT
 GGGGCTGTCA TCATGTTTCT CCTCAATTTT GAGGTGGTGA TGGAGAAGGA CATGGTGGGG
 TCCCGGCTC ATGACACCAA CCACCGGGG CCCCCACCA GCTGGCTGGC CCCAGGCCGC
 GCCAAGACCT TCCGCTGAA GCTGCCCCGC CTGCTGGCGC TGACGGCCCC GGAGTCGTCTG
 GTGCGGTCCG GCGGCGCGGG CGGCGCGGGC GCCCCGGGG CCGTGGTGGT GGACGTGGAC
 CTGACGCCCG CGGCACCCAG CAGCGAGTCG CTGGCCCTGG ACGAAGTGAC AGCCATGGAC
 AACACAGTGG CAGGGCTCGG GCCCCGCGAG GAGCGGCTG CGCTGGTGGG TCCCGGCTCT
 CCGCCCCGCA GCGCGCCCCG CCAGCTCCCA TCGCCCCGGG CGCACAGCCT CAACCCCGAC
 GCCTCGGGCT CCAGCTGCAG CCTGGCCCCG ACGCGCTCCC GAGAAAGCTG CGCCAGCGTG
 CGCCGCGCCT CGTCGGCCGA CGACATCGAG GGCATGCGAC CCACTGCGCA GCGGCTTGCT CAACTCCACC
 CCGCGCCACG CCAGCACCGG GGCCATGCGC CTACGCGACC ATTAGCAAGA TTCCCCAAAT CACCCTCAAC
 TCGGACTCCG ACCTCGTGCG CTACCGCACC ATTAGCAAGA TTCCCCAAAT CACCCTCAAC
 TTTGTGGACC TCAAGGGCGA CCCCTTCTTG GCTTCGCGCA CCAGTGACCG TGAGATCATA
 GCACCTAAGA TAAAGGAGCG AACCCACAAT GTCACGTAGA AGGTCACCCA GGTCCTGTCC
 CTGGGCGCCG ACGTGCTGCC TGAGTACAAG CTGCAGGCAC CGCGCATCCA CCGCTGGACC
 ATCCTGCATT ACAGCCCCCTT CAAGGCCGTG TGGGACTGGC TCATCCTGCT GCTGGTCATC
 TACACGGCTG TCTTCACACC CTACTCGGTG GCCTTCCTGC TGAAGGAGAC GGAAGAAGGC
 CCGCTCGCTA CCGAGTGTGG CTACGCTGCG CAGCGCTGG CTGTGGTGA CCTCATCGTG
 GACATCATGT TCATTGTGGA CATCCTCATC AACTTCCGCA CCACCTACGT CAATGCCAAC
 GAGGAGGTGG TCAGCCACCC CGGCCGCATC GCGTCCACT ACTTCAAGGG CTGGTTCCTC
 ATCGACATGG TGGCCGCCAT CCCCTTCGAC CTGCTCATCT TCGGCTCTGG CTCTGAGGAG
 CTGATCGGGC TGCTGAAGAC TGCGCGGCTG CTGCGGCTGG TGCGCGTGGC GCGGAAGCTG
 GATCGCTACT CAGAGTACGG CGCGGCCGTG CTGTTCTTGC TCATGTGCAC CTTTGCGCTC
 ATCGCGCACT GGCTAGCCTG CATCTGGTAC GCCATCGGCA ACATGGAGCA GCCACACATG
 GACTACGCA TCGGCTGGCT GCACAACCTG GGCGACCAGA TAGGCAAACC CTACAACAGC
 AGCGGCCTGG GCGGCCCTC CATCAAGGAC AAGTATGTGA CCGCGCTCTA CTTACCTTC
 AGCAGCCTCA CCAGTGTGGG CTTGCGCAAC GTCTCTCCCA ACACCAACTC AGAGAAGATC
 TCTCCATCT GCGTCATGCT CATTGGCTCC CTCATGTATG CTAGCATCTT CCGCAACGTG
 TCGGCCATCA TCCAGCGGCT GTACTCGGGC ACAGCCCGCT ACCACACACA GATGCTGCGG
 GTGCGGGAGT TCATCCGCTT CCACCAGATC CCAATCCCC TGCGCCAGCG CCTCGAGGAG
 TACTTCCAG ACGCCCTGGT CTACACCAAC GGCATCGACA TGAACGCGGT GCTGAAGGGC
 TCCCTGAGT GCGTGCAGG TGACATCTGC CTGCACCTGA ACCGCTCACT GCTGCAGCAC
 TGCAAAACCT TCCGAGGGG CACCAAGGGC TGCCTTCGGG CCCTGGCCAT GAAAGTTCAAG
 ACCACACATG CACCGCCAGG GGACACACTG GTGCATGCTG GGGACCTGCT CACCGCCCTG
 TACTTCATCT CCCGGGGCTC CATCGAGATC CTGCGGGGCG ACGTCGTCGT GGCCATCCTG
 GGGAAAGATG ACATCTTTGG GGAGCCTCTG AACCTGTATG CAAGGCCTGG CAAGTCGAAC
 GGGGATGTGG GGGCCCTCAC CTACTGTGAC CTACACAAGA TCCATCGGGA CGACCTGCTG
 GAGGTGCTGG ACATGTACCC TGAGTTCTCC GACCATTCT GGTCCAGCCT GGAGATCACC
 TTCAACCTGC GAGATACCAA CATGATCCCG GGCTCCCCCG GCAGTACGGA GTTAGAGGGT
 GGCTTCAGTC GGCAACGCAA GCGCAAGTTG TCCTTCCGCA GGCGCACGGA CAAGGACACG
 GAGCAGCCAG GGGAGGTGTC GGCCTTGGGG CCGGGCCGGG CCGGGGCGAG GCCGAGTAGC
 CGGGGCCGGC CCGGGGGGGC GTGGGGGGAG AGCCCGTCCA GTGGCCCTC CAGCCCTGAG
 AGCAGTGAGG ATGAGGGGCC AGGCCGCGAG TCCAGCCCCC TCCGCTGGT GCCCTTCTCC
 AGCCCCAGG CCCCCGGAGA GCCGCCGGGT GGGGAGCCCC TGATGGAGGA CTGCGAGAAG
 AGCAGCGACA CTTGCAACCC CCTGTCAGG GCCTTCTCAG GAGTGCCAA CATTTTCAGC
 TTCTGGGGGG ACAGTCGGGG CCGCCAGTAC CAGGAGCTCC CTCGATGCCC CGCCCCCACC
 CCCAGCCTCC TCAACATCCC CCTCTCCAGC CCGGGTCGGC GGCCCCGGGG CGACGTGGAG
 AGCAGGCTGG ATGCCCTCCA GCGCCAGCTC AACAGGCTGG AGACCCGGCT GAGTGCAGAC
 ATGGCCACTG TCCTGCAGCT GCTACAGAGG CAGATGACGC TGGTCCCGCC CGCTGTTGCC
 GCTGTGACCA CCCCCGGGGC TGGCCCCACT TCCACATCCC CGCTGTTGCC AGTTTCATGGC
 CTCCCCACCC TCACCTTGGA CTCGCTTTCT CAGGTTTCCC AGTTTCATGGC GTGTGAGGAG
 CTGCCCCCGG GGGCCCCAGA GCTTCCCCAA GAAGGCCCA CACGACGCT CTCCCTACCG
 GGCCAGCTGG GGGCCCTCAC CTCCAGCCC CTGCACAGAC ACGGCTCGGA CCCGGGAGT
 TAGTGGGGCT GCCCAGTGTG GACACGTGGC TACCCAGGG ATCAAGGCGC TGCTGGGCCG
 CTCCCCCTGG AGGCCCTGCT CAGGAGGCC CTTCTCCTGC AGTCCCCCTG GCCCCAGTGA
 CACAGCTCCT CCCCCAGCCC TTGGGACCAT GGCAGTAGGT GGGCCTGTGG TCCCCCACT
 GAGGGGCGAG GGCAGGGCCG CGGAGGACC CTTAGGCAC CTTAGGCAC CTCAAGGACT
 CATTAGCTGG TCTAAGTGCC CGGAGGACC GATTAATAATT AAGGATCATA TGAATAATTA
 TTTCTGCTAT TTACTGCTCT TATTGTTAAG GATAATAATT AAGGATCATA TGAATAATTA
 ATGAAGATGC TGATGACTAT GAATAATAAA TAATTATCCT GAGGAGAAAA

Fig.4B

//

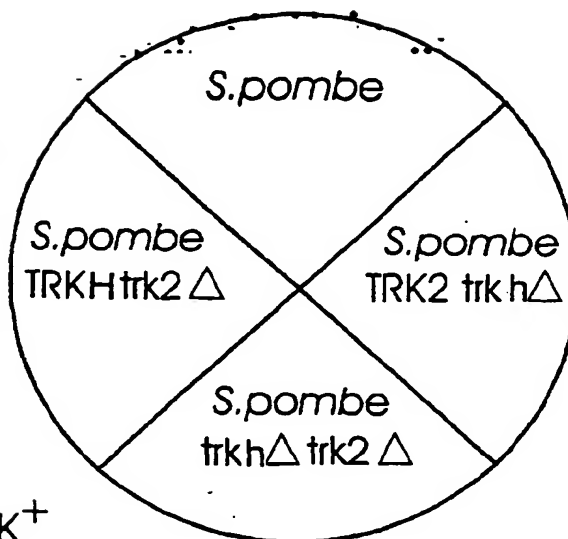
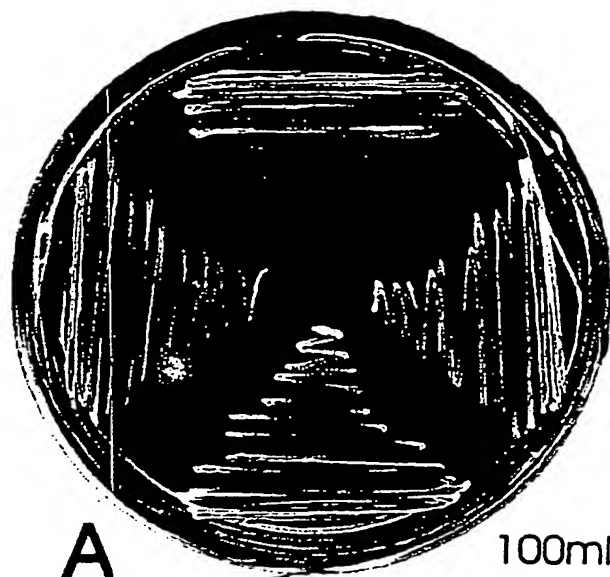


Fig.5

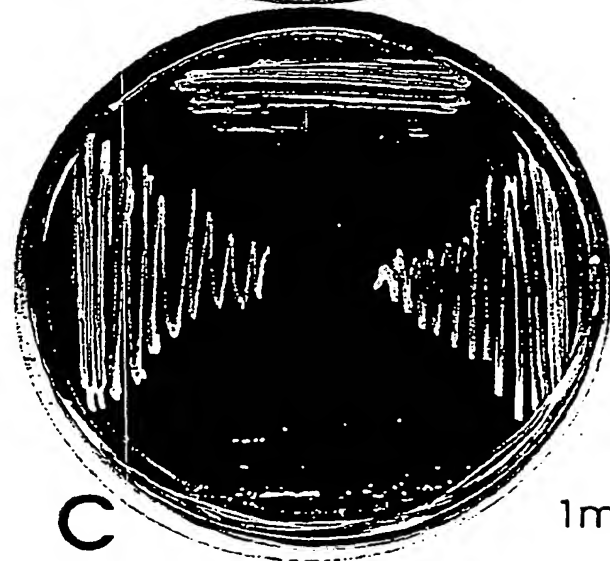
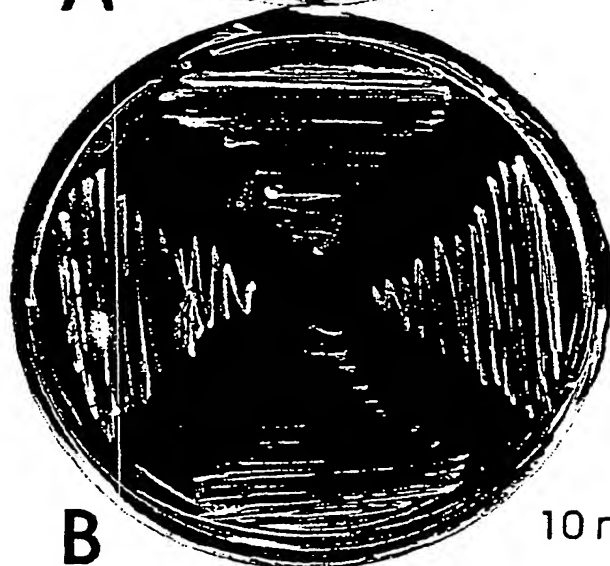


Fig.6

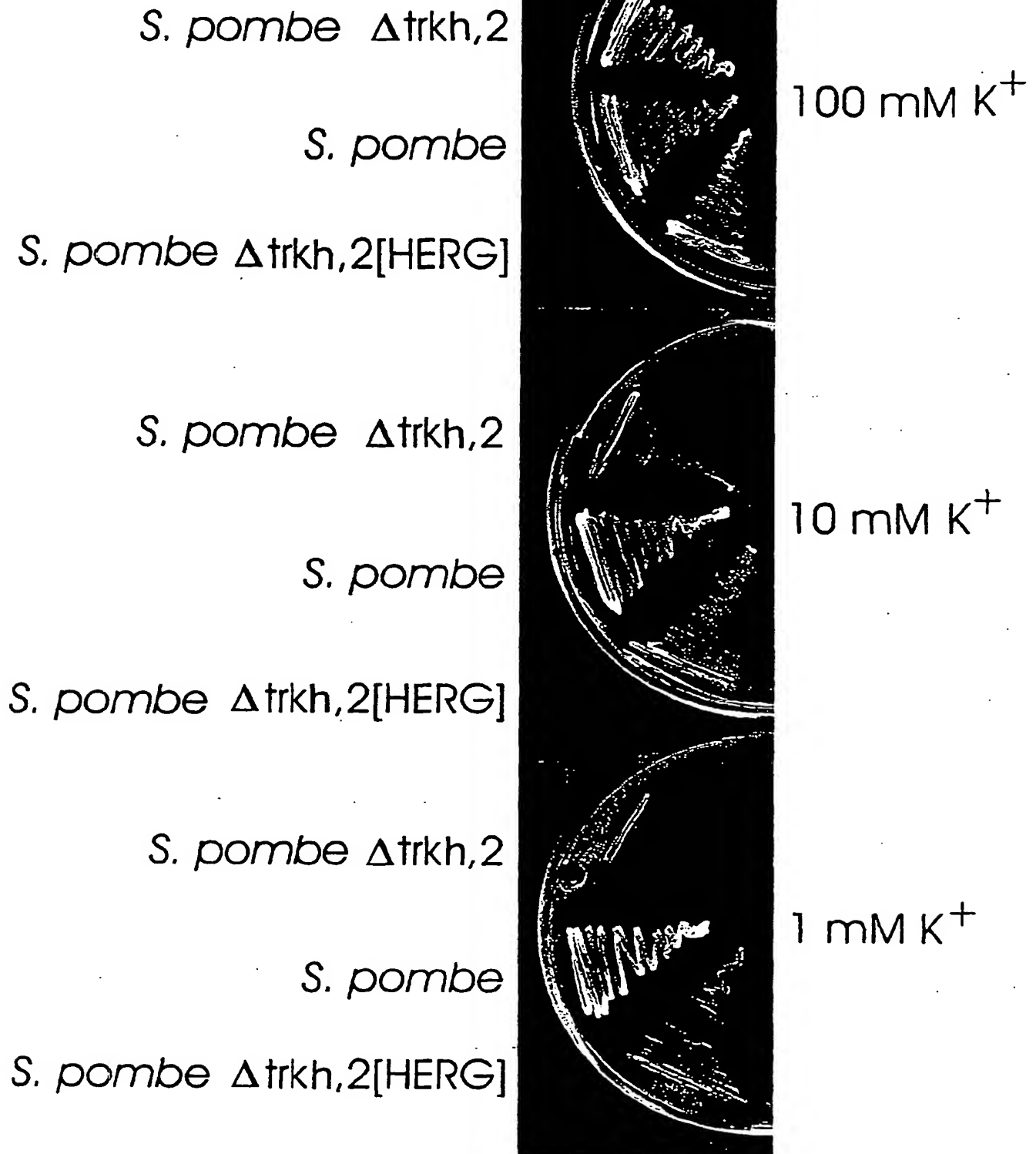
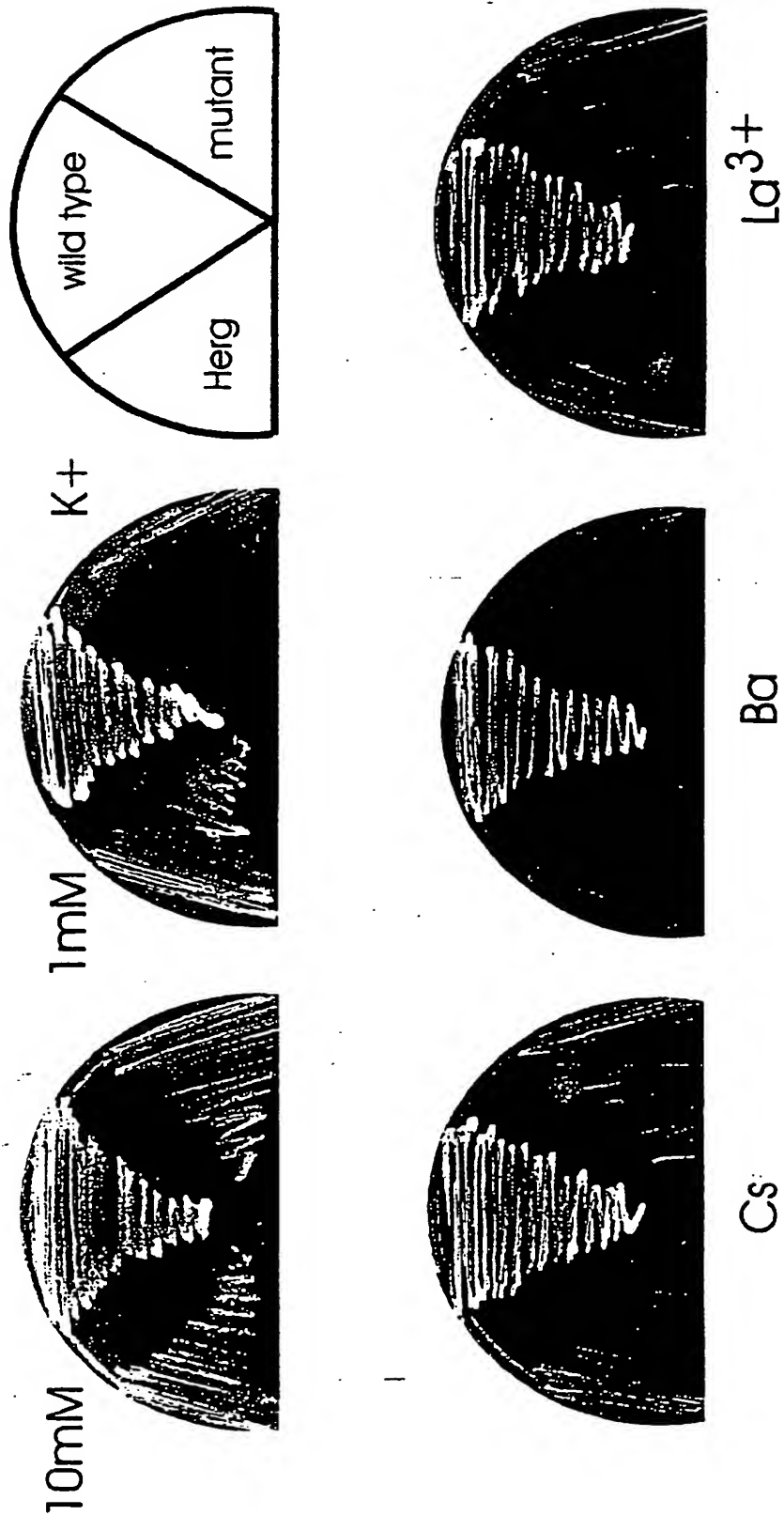


Fig.7



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.